

НАБОР ИФА

ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КРЕАТИНКИНАЗЫ-МВ

1005-15, СК-МВ

Каталог. № : 1005-15

Методика от 10-10-2009

Количество : 96

Производитель: **Diagnostic Automation, Inc. (США)**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

Предназначение: Количественное определение концентраций циркулирующей креатинин киназы (МВ-изоформы) в сыворотке человека путем микропланшетного иммуноферментного анализа.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА

Креатинин киназа (СК) - фермент, находящийся прежде всего в мышце и мозговой ткани в виде трех димерных изоферментов – СКММ (СК-3), СК-МВ (СК-2, и СК-ВВ (СК-1) – в основе которых субъединицы М и В. На изофермент СК-МВ, имеющий молекулярную массу приблизительно 87,000 дальтонов, ложится от 5 до 50% общей активности СК в миокарде. Напротив, в скелетной мышце, он обычно отвечает только за 1% или меньше. Процент СК-ММ, являющегося доминирующей формой, может составлять даже 10% в состояниях, отражающих травму скелетной мышцы и регенерацию (например, сильные физические нагрузки, дистрофия, полимиозит).

Последовательное измерение биохимических маркеров теперь считается важным фактором в обнаружении или исключении острого инфаркта миокарда. СК-МВ - один из наиболее важных маркеров миокарда (будучи в целом не кардиально-специфическим), с хорошо утвержденным значениями при подтверждении острого инфаркта миокарда (ОИМ) и при контроле реперфузии в течении тромболитической терапии после ОИМ.

При ОИМ уровень СК-МВ в плазме обычно повышается приблизительно в период от 3 до 8 часов после появления болей в груди. Он достигает максимума в пределах от 9 до 30 часов, и возвращается к обычному уровню в пределах от 48 до 72 часов. Образец последовательных определений СК-МВ более информативен, чем одиночное определение. Одно измерение СК-МВ, даже когда проведено в соответствующее время, не может окончательно подтвердить или исключить факт ОИМ. Высокие уровни скорее могут отражать скелетную травму, чем повреждение миокарда. Значение в пределах референтного диапазона может иметь значение, если оно указывает на увеличение в сравнении с базовыми уровнями пациента. Соответственно, рекомендуется измерять СК-МВ до поступления в отделение неотложной помощи, и через равные промежутки времени после этого. Предложенная отделением неотложной помощи сердца модель зафиксировала последовательное изучение массы изофермента СК-МВ (СК-МВ, ЕС 2.7; 3.2) по его представлению и 3,6 и 9 часами позже в пациентах с признаками, свойственными для острого ишемического коронарного синдрома. Исследование проводилось путем диагностической или эквивалентной электрокардиограммы, и оказалась более эффективной (чувствительность 100% с 100% отрицательным прогнозирующим значением) чем непрерывные последовательные электрокардиограммы, электрокардиография и изучение последовательно изменяющейся физической нагрузки.

В этом методе калибратор СК-МВ, образец пациента или контроль сначала вносятся в лунки, покрытые стрептавидином. Добавляются биотинилированные, моноклональные и меченные ферментом антитела (направленные против видимого и другого эпитопов СК-МВ), и перемешиваются реагенты. Реакция между различными антителами СК-МВ и нативной СК-МВ формирует комплекс "сэндвича", который связывает со стрептавидином, нанесенным на лунку.

После завершения заданного инкубационного периода, фермент-СК-МВ связанный конъюгат антител отделяется от несвязанного фермент-СК-МВ конъюгата аспирацией или декантацией. Активность фермента, присутствующего на поверхности лунки, определяется количественно путем реакции с соответствующим субстратом с последующим образованием цвета.

Использование нескольких референтных сывороток с известными уровнями (СК-МВ) позволяет создать кривую чувствительности дозы активности и концентрации. От сравнения до характеристики

чувствительности дозы активность неизвестного образца можно сопоставить с концентрацией СК-МВ.

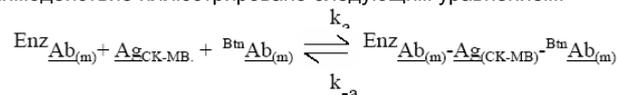
ПРИНЦИП

Имуноферментометрический анализ:

Необходимые реагенты, требуемые для иммуноферментометрического анализа, включают антитела высокого сродства и специфичности (конъюгированный и зафиксированный фермент) с **полным** распознаванием отличающегося и определенного эпитопа и нативного антигена. В этой процедуре, иммобилизация имеет место в течение анализа на поверхности лунки микропланшета при взаимодействии нанесенного на лунку стрептавидаина и экзогенно добавленного биотинилированного моноклонального анти-СК-МВ антитела.

При смешивании биотин меченного моноклонального антитела, фермент-меченного антитела и сыворотки, содержащей нативный антиген, происходит реакция между нативным антигеном и антителами без соревнования или стеаринового несоответствия, формируя растворимый комплекс "сэндвича".

Взаимодействие иллюстрировано следующим уравнением:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$ = биотинилированное моноклональное антитело (чрезмерное количество)

$\text{Ag}_{\text{СК-МВ}}$ = нативный антиген (непостоянное количество)

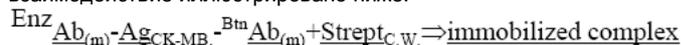
$\text{Enz}_{\text{Ab(m)}}$ = фермент меченное MoAb (чрезмерное количество)

$\text{Enz}_{\text{Ab(m)}}-\text{Ag}_{\text{СК-МВ}}-\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$ = комплекс антигена антител

k_a = константа ассоциации

k_{-a} = константа диссоциации

Одновременно, комплекс осаждает лунку через реакцию высокого сродства стрептавидаина и биотинилированного антитела. Это взаимодействие иллюстрировано ниже:



$\text{Strept}_{\text{C.W.}}$ = стрептавидин, зафиксированный на лунке

Immobilized complex = закрепленный на твердой поверхности «сэндвич» комплекс.

После того, как равновесие достигнуто, фракция связанных антител отделяется от несвязанного антигена декантацией или аспирацией. Ферментная активность во фракции связанных антител прямо пропорциональна концентрации нативных антигенов. Используя несколько различных референтных сывороток известных значений антигена, дает возможность вывести характеристику чувствительности дозы, из которой может быть установлена концентрация антигенов неизвестного образца.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ:

А. Калибраторы СК-МВ - 1.0 мл/фл. (Леофилизованные) [A-F]. Шесть (6) флаконов референтного материала для антигена СК-МВ на уровнях 0 (A), 5.0 (B), 25.0 (C), 100.0 (D), 200 (E), и 400 (F) нг/мл. Перерастворите каждую пробирку 2.0мл дистиллированной или деионизированной воды. Перерастворенные калибраторы стабильны в течение 7 дней при 2-8°C. Для хранения в течение более длительного времени, аликвотируйте перерастворенные калибраторы в криопробирках и храните при -10°C. **НЕ ЗАМОРАЖИВАТЬ/РАЗМОРАЖИВАТЬ БОЛЕЕ ОДНОГО РАЗА.** Добавлен консервант.

Примечание: калибраторы, взятые из человеческой сыворотки, были откалиброваны с использованием гравиметрического белкового веса путем > 99% очистительной подготовки.

В. Ферментный Реагент СК-МВ - 13 мл/фл [Значок E]

Один (1) флакон, содержащий меченное ферментом сродное очищенное антитело и биотин меченный моноклональный мышинный IgG в буфере, красителя, и консерванте. Хранить при 2-8°C.

С. Стрептавидиновый микропланшет – 96 лунок - [Значок U]

Один 96-луночный микропланшет, покрытый стрептавидином и упакованный в пакет из фольги с осушителем. Хранить при 2-8°C.

Д. Концентрат промывочного раствора – 20 мл [Значок D]

Один (1) флакон, содержащий поверхностно-активное вещество в буферизированном солевом растворе. Добавлен консервант. Хранить при 2-30°C.

Е. Субстрат А - 7.0 мл/фл. - [Значок S^A]

Одна (1) бутылка, содержащая тетраметилбензидин (ТМВ) в буфере. Хранить при 2-8°C.

Ф. Субстрат В - 7.0 мл/фл. - [Значок S^B]

Одна (1) бутылка, содержащая перекись водорода (H₂O₂) в буфере. Хранить при 2-8°C.

Г. Стоп раствор - 8.0 мл/фл. – [Значок STOP]

Одна (1) бутылка, содержащая сильную кислоту (1N HCl). Хранить при 2-30°C.

Н. Инструкция пользователя

Примечание 1: Не используйте реагенты вне срока годности набора.

Примечание 2: открытые реагенты стабильны шестьдесят (60) дней в течение хранения при 2-8°C.

Примечание 3: Вышеуказанные реагенты предназначены для одного 96-луночного микропланшета.

Требуемые, но не поставляемые:

1. Микропипетка(и) для точного дозирования 25 и 50 мкл с точностью более чем 1,5%.
2. Многоканальный дозатор(ы) для повторных дозирования объемом 0,100 и 0,300 мл с точностью более чем 1,5% (выборочно).
3. Микропланшетный промыватель или гибкая бутылка (выборочно).
4. Микропланшетный считыватель с длиной волны измерения абсорбции 450 и 620 нм (фильтр на 620 нм - выборочный);
5. Промокательная бумага для промокания. Лунок микропланшета.
6. Полиэтиленовая пленка или накрыватель микропланшета для этапов инкубации.
7. Вакуумный аспиратор (выборочно) для этапов промывки.
8. Таймер.
9. Контейнер для хранения промывочного буфера.
10. Дистиллированная или деионизированная вода.
11. Материалы контроля качества.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ:

1. Промывочный буфер

Разбавить содержимое промывочного концентрата до 1000 мл дистиллированной или деионизированной водой в соответствующей таре для хранения. Хранить при комнатной температуре 20-27°C до 60 дней.

2. Раствор рабочего субстрата

Вылить содержимое флакона, меченного как Раствор 'A' во флакон, меченный как Раствор 'B'. Перемешать и хранить при 2-8°C. Использовать в течение 60 дней. При более длительном использовании определить количество требуемого реагента и приготовить путем смешивания равных частей Субстрата A и Субстрата B в соответствующую емкость. Например, добавить 1 мл A и 1 мл B в две (2) восьмилучные полоски (образуется остаток. Неиспользованную часть удалить).

Примечание: Не использовать рабочий раствор если он выглядит синим.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Для диагностического использования *in vitro*.

Не для внутреннего или внешнего применения на людях или животных

Все продукты, которые содержат человеческую сыворотку, оказались не реагирующими к поверхностному антигена гепатита B, ВИЧ 1&2 и антителам вируса гепатита C при использовании FDA утвержденных реагентов. Так как никакой известное испытание не может предоставить полной уверенности в отсутствии возбудителей инфекции, все человеческие серологические продукты должны быть обработаны как потенциально опасные и способные к передаче болезни. Соответствующие лабораторные процедуры по обработке продуктов крови предоставляются в Центре контроля болезней при Национальном институте здоровья, «Биологическая опасность в микробиологических и биомедицинских Лабораториях», 2-ое издание, 1988, Министерство здравоохранения и социальных служб США.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

В этом анализе должна использоваться сыворотка крови с соблюдением обычных предосторожностей при заборе образцов путем венепункции. Для точного сравнения с установленными значениями нормы необходимо получить натошак утренний образец сыворотки. Кровь необходимо собрать в капиллярную пробирку без консервантов. Позволить крови свернуться. Центрифугировать образец чтобы отделить сыворотку от клеток. Центрифугирование образцов сыворотки до полного свертывания может привести к наличию фибрина. Во избежание ошибочных результатов исходя из наличия фибрина убедитесь, что до центрифугирования образцов произошло полное свертывание.

Образцы могут храниться при 2-8°C не более чем 2 дня. Если образец(ы) не может анализироваться в пределах этого времени, образец(ы) может храниться при температуре -20°C до 30 дней. Избегайте циклов многократного замораживания / размораживания. При анализе в двойном экземпляре требуется 0.100 мл образца.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Перед началом анализа привести все реагенты, референтные сыворотки и контроли к комнатной температуры (20-25°C).

1. Поместить нужное количество лунок в рамку для калибратора, контроля и образца пациента для анализа в двойном экземпляре. **Поместить неиспользуемые полоски микролунок назад в пакет из фольги. Запечатать и хранить при 2-8°C.**
2. Раскатать 0,025 мл (25 мкл) соответствующих калибраторов, контролей и образцов в приготовленные лунки.
3. Добавить 0,100 мл (100 мкл) ферментного реагента СК-МВ в каждую лунку. **Очень важно распределять все реагенты ближе ко дну лунки.**
Примечание: для быстрого распределения ферментного реагента используйте многоканальную пипетку, чтобы избежать смещения если распределение может занять более нескольких минут.
4. Осторожно покачать микропланшет в течении 20-30 чтобы перемешать его содержимое. Накрывать полиэтиленовой пленкой.
5. Инкубировать при комнатной температуре (20-25°C) 15 минут.
6. Удалить содержимое микропланшета декантацией или аспирацией. При декантации постучать по планшету и промокнуть его промокательной бумагой.
7. Добавить 300 мкл промывочного буфера (см. Раздел Подготовка Реагентов), декантировать (постучать и протереть) или аспирировать. Повторить еще два (2) раза, в общем количестве три (3) промывки. **Возможно использование автоматического или ручного промывателя планшета. Необходимо следовать указаниям производителя по правильному использованию. Если используется гибкая бутылка, заполнить каждую лунку до края, сжимая емкость. Избегать воздушных пузырьков. Декантировать раствор и повторить промывку еще два (2).**
8. Добавить 0,100 мл (100 мкл) раствора рабочего субстрата во все лунки (см. Раздел Подготовка Реагентов).
9. Инкубировать при комнатной температуре (20-25°C) 15 минут.
10. Добавить 0.050 мл (50 мкл) стоп раствора в каждую лунку и осторожно помешать в течении 15-20 секунд. Считать абсорбцию в каждой лунке при 450 нм (используя референтную длину волны 620-630 нм, чтобы минимизировать недостатки считывания лунки) на микропланшетном считывателе. **Результаты необходимо считать в пределах тридцати (30) минут после добавления стоп раствора.**
ПРИМЕЧАНИЕ: Всегда добавлять реагенты в том же самом порядке, чтобы минимизировать разницу времени реакции между лунками.

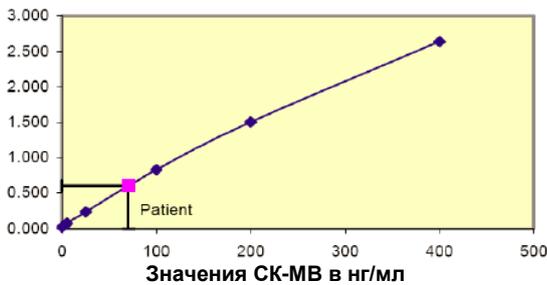
КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для мониторинга за эффективностью анализа каждая лаборатория должна анализировать контроли на низком уровне, обычном и повышенном. Эти контроли должны рассматриваться как неизвестные и значения должны определяться в каждой процедуре анализа. Контроль качества необходимо соблюдать при мониторинге стабильности каждой партии наборов.

Пример 1

Sample ID	Well Number	Abs (A)	Abs (B)	Mean Abs (B)	Value (ng/ml)
Cal A	A1	0.022	0.022	0	0
	B1	0.023			
Cal B	C1	0.072	0.071	5.0	5.0
	D1	0.070			
Cal C	E1	0.243	0.236	25.0	25.0
	F1	0.230			
Cal D	G1	0.851	0.833	100	100
	H1	0.815			
Cal E	A2	1.503	1.504	200	200
	B2	1.505			
Cal F	C2	2.567	2.612	400	400
	D2	2.658			
Ctrl 1	E2	0.046	0.049	2.35	2.35
	F2	0.052			
Ctrl 2	G2	.598	.592	70.3	70.3
	H2	.598			
Patient 1	A3	0.140	.136	12.4	12.4
	B3	0.131			

Рисунок 1



*Данные, представленные в Примере 1 - только для иллюстрации и не должны использоваться вместо характеристики чувствительности дозы, подготовленной с каждым анализом.

ПАРАМЕТРЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Чтобы результаты анализа считались действительными, должны быть выполнены следующие критерии:

1. Абсорбция (ОП) калибратора 'А' должна быть ≤ 0.1 .
2. Абсорбция (ОП) калибраторов 'F' должна быть ≥ 1.3 .
3. Четыре из шести объединений контролей качества должны быть в пределах установленных диапазонов.

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Кривая ответной дозы используется для подтверждения концентрации СК-МВ в неизвестных образцах.

1. Зафиксировать абсорбцию, полученную из распечатки микропланшетного считывателя как указано в Примере 1.
2. На линейной графической бумаге вывести среднюю абсорбцию каждой референтной сыворотки в двойном экземпляре против соответствующей концентрации СК-МВ в нг/мл (не усредняйте дубликаты референтных сывороток перед построением кривой).
3. Выведите через отложенные точки наиболее соответствующую кривую.
4. Чтобы определить концентрацию СК-МВ неизвестного образца, расположите среднюю абсорбцию дубликатов каждого неизвестного образца на вертикальной оси графика, найдите пересекающуюся точку на кривой, и считайте концентрацию (в нг/мл) с горизонтальной оси графика (дубликаты неизвестного значения могут быть усреднены как указано). В следующем примере средняя абсорбция (0.136) пересекает кривую ответной дозы в точке концентрации СК-МВ (12.4 нг/мл) (См. Рисунок 1).

Примечание: компьютерное программное обеспечение обработки данных, разработанное для ИФА компании DAI, может также использоваться для обработки данных.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. Для воспроизводимости результатов важно, чтобы время реакции в каждой лунке было одинаковым.
2. Во избежание сбоев анализа распыливание образцов не должно превышать десяти (10) минут.
3. Если используется больше чем один (1) планшет, рекомендуется повторить характеристику чувствительности дозы.
4. Добавление раствора субстрата вызывает кинетическую реакцию, которая останавливается добавлением стоп раствора. Поэтому, добавление субстрата и стоп раствора должно проводиться в той же самой последовательности, чтобы избежать любое отклонение времени в течение реакции.
5. Считыватели планшета измеряют вертикально. Не касайтесь дна лунок.
6. Недостаточное удаление раствора в этапе(ах) аспирации или декантации может привести к недостаточной репликации и ложным результатам.
7. Высоко липемический, гемолизированный или чрезвычайно загрязненный образец(цы) не должен использоваться.
8. Образцы пациентов с концентрациями СК-МВ более чем 400 нг/мл могут разбавляться нулевым калибратором и заново анализироваться. Для получения исправленного значения следует умножить полученное значение на коэффициент разбавления.
9. Использовать компоненты набора одной и той же партии. Не допускать смешивания реагентов из разных партий.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Значения СК-МВ равным образом выше в плазме чем в сыворотке; таким образом, сыворотка предпочтительна. По сравнению со значениями образцов взятых натощак в неполных пациентах, не страдающих диабетом, уровни СК-МВ выше в неполных недиабетических субъектах и ниже в подготовленных атлетов. Каждой лаборатории рекомендуется установить свои собственные диапазоны для пациентов без отклонений и с отклонениями. Эти

диапазоны всегда зависят от региона, населения, лаборатории, методики и специфики метода.

Основываясь на клинических данных, собранных производителем в соответствии с изданной литературой, были установлены следующие диапазоны. Эти диапазоны должны использоваться только как рекомендации:

Совершеннолетний (норма) 2.0 - 5.2 нг/мл.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

А. Точность

Точность системы микропланшетного анализа СК-МВ ELISA в пределах и между анализами была определена в анализах трех различных уровней объединенных контрольных сывороток. Количество, среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации для каждой из этих контрольных сывороток представлены в Таблице 2 и Таблице 3.

ТАБЛИЦА 2

Точность в пределах анализа (значения в нг/мл)

ОБРАЗЕЦ	К-во	X	σ	К.В.
Объединение 1	20	0.82	0.07	8.53%
Объединение 2	20	12.11	0.59	4.87%
Объединение 3	20	58.10	3.74	6.44%

ТАБЛИЦА 3

Точность между анализами (значения в нг/мл)

ОБРАЗЕЦ	К-во	X	σ	К.В.
Объединение 1	20	0,86	0,09	10,4%
Объединение 2	20	13,31	1,22	9,16%
Объединение 3	20	52,52	2,84	5,45%

*Согласно измерения в 10 экспериментах в двойном экземпляре на протяжении 10 дней.

В. Точность

Микропланшетный анализ СК-МВ ELISA компании *Diagnostic Automation, Inc.* был сравнен с предикатным радиоиммуноанализом. Были использованы биологические образцы населения (симптоматического и асимптоматического). (Значения были определены в диапазоне от Н/О – 86 гн/мл). Общее количество таких образцов было 124. Полученные данные отображены в Таблице 4.

ТАБЛИЦА 4

Метод	Среднее (x)	Анализ наименьшей квадратической регрессии	Коэффициент корреляции
Данный метод (y)	12.52	$y = 0.5477 + 0.9946(x)$	0.995
Референтный (x)	12.04		

Только небольшие отклонения между степени диагональности между системой ELISA СК-МВ и референтным методом обозначен близостью средних значений.

Наименьшее уравнение квадратической регрессии и коэффициента корреляции указывает на превосходное субординацию метода.

С. Чувствительность

Чувствительность (предел определения) был установлен путем определения вариабильности 0 нг/мл серологического калибратора и использования 2σ (уверенность 95%) статистически чтобы вычислить минимальную дозу. Чувствительность анализа составила 0.05 нг/мл.

Д. Специфичность

Перекрестная реактивность СК-МВ ELISA метода по отношению к выбранным веществам была оценена путем добавления в определенной концентрации(ях) интерферирующего вещества(в) к серологической основе. Используемая система антител не обнаружила ни одной из СК-ВВ или СК-ММ изоформ в анализе при очень высоких концентрациях.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»