

Креатинкиназа (Creatine Kinase TEST SYSTEM)

AccuBind™ ELISA Microwells

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ НАБОР ДЛЯ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ КРЕАТИН КИНАЗЫ (МВ
ИЗОФЕРМЕНТА, СК-МВ)
Creatinine Kinase (MB-Isoform)

Назначение: количественное определение концентрации циркулирующей креатин киназы (МВ-изоформы) в человеческой сыворотке методом иммуноферментного анализа в микропланшетном формате, колориметрия.

ВВЕДЕНИЕ

Креатин киназа (СК) – это фермент, первично выявленный в мышечных тканях и тканях мозга, который существует в виде трех димерных изоферментов — СКММ (СК-3), СК-МВ (СК-2) и СК-ВВ (СК-1) — состоящих из субъединиц, обозначаемых М и В. Изофермент СК-МВ, с молекулярной массой приблизительно 87,000 Дальтон, составляет от 5 до 50% от всей активности СК миокарда. В скелетных мышцах, наоборот, в норме он составляет менее 1%, а доминантной формой является СК-ММ, она может составлять до 10%, при различных условиях, отражая повреждение или регенерацию скелетной мышцы (например, тяжелая нагрузка, мышечная дистрофия, полимиозит).²

В настоящее время серийные измерения биохимических маркеров приняты повсеместно, как важный инструмент для постановки или исключения острого инфаркта миокарда. СК-МВ является одним из важнейших миокардиальных маркеров (не смотря на то, что не является кардио-специфическим), с хорошо установленной ролью при подтверждении острого

инфаркта миокарда (АМІ) и при мониторинге реперфузии в период тромболитической терапии, сопровождающей АМІ.²

При АМІ, концентрация СК-МВ в плазме обычно возрастает в течение 3 - 8 часов после приступа боли в груди, достигает пика в течение 9 - 30 часов, и возвращается к базовой линии в течение 48 - 72 часов.⁷ Серийные определения СК-МВ более информативны, чем единичное определение. Единичное измерение СК-МВ, даже выполненное в соответствующее время, не может точно подтвердить или опровергнуть наличие АМІ. Высокие уровни могут отражать как повреждения миокарда, так и скелетные повреждения. Значение, лежащее в диапазоне нормальных значений, может быть значимым, если представляет повышение по сравнению с индивидуальным базовым уровнем пациента. Таким образом, рекомендуется проводить определения СК-МВ при поступлении в реанимационное отделение, а затем регулярно с определенными интервалами времени. Схема, описанная Программой Кардиологического Реанимационного Отделения (Heart Emergency Room (ER) Program^{113'}) подтверждено, что серийные определения изофермента СК-МВ (СК-МВ, ЕС 2.7;3.2) проведенные в момент презентации и через 3,6 и 9 часов, у пациентов с симптомами, заставляющими предположить наличие острого ишемического коронарного синдрома, с отрицательными или сомнительными результатами электрокардиограммы, были более эффективны (100% чувствительности и 100% прогностическая значимость отрицательного результата), чем продолжительные серийные электрокардиограммы электрокардиография и тест с физической нагрузкой.

В данном методе в лунки микропланшета, покрытые стрептавидином, вносят сначала калибратор СК-МВ, образец пациента или контрольный материал. Затем вносят биотинилированные моноклональные и меченые ферментом антитела, к определенным и разным эпитопам СК-МВ, после чего реагенты смешивают. Реакция между различными антителами к СК-МВ и нативным СК-МВ приводит к образованию сэндвич-комплекса, который связывается со стрептавидином, фиксированным в лунках микропланшета.

После окончания необходимого периода инкубации ферментные антитела к СК-МВ, связанные с конъюгатом, отделяют от несвязанного ферментного конъюгата с СК-МВ за счет аспирации или декантирования. Активность фермента, присутствующего на поверхности лунок, количественно определяется реакцией с подходящим субстратом для получения окрашивания.

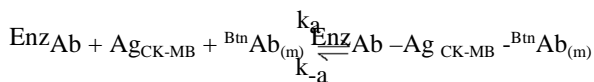
Использование нескольких референсных сывороток с известными уровнями СК-МВ позволяет построить кривую зависимости доза-ответ (активность от

концентрации). При сравнении с кривой зависимости дозы – активность определяется концентрация лугенизирующего гормона в неизвестном образце.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Последовательный иммуоферментный анализ (тип 3)

Основными реагентами, необходимыми для проведения иммуоферментного анализа, являются высокоафинные и специфичные антитела (ферментные и фиксированные) с различными отдельными эпитопами для распознавания в избытке и нативный антиген. В данной процедуре иммобилизация на поверхности лунок микропланшета происходит во время проведения анализа при взаимодействии стрептавидина и экзогенных внесенных биотинилированных моноклональных антител к СК-МВ. После смешивания моноклональных биотинилированных антител с сывороткой, содержащей нативный антиген, нативный антиген и антитела реагируют друг с другом с формированием комплекса антиген-антитело без конкуренции или стерических препятствий с формированием растворимого «сэндвич» комплекса. Взаимодействие описывается следующим уравнением реакции:



$({}^{\text{Btn}})\text{Ab}_{(\text{m})}$ = биотинилированные моноклональные антитела (избыточное количество)

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

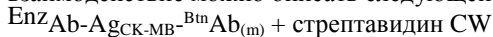
EnzAb = Антитела, меченные ферментом (избыточное количество)

$\text{EnzAb} - \text{Ag}_{\text{СК-МВ}} - {}^{\text{Btn}}\text{Ab}_{(\text{m})}$ = «Сэндвич» комплекс антиген-антитело

k_a – константа скорости ассоциации

$k-a$ – константа скорости диссоциации

За счет высокоафинной реакции стрептавидиновых и биотинилированных антител образовавшиеся комплексы фиксируются на лунках микропланшета. Это взаимодействие можно описать следующей реакцией:



⇒ Иммобилизованный комплекс

стрептавидин CW = стрептавидин, иммобилизованный в лунках микропланшета

Иммобилизованный комплекс = «сэндвич» комплекс, фиксированный в лунках

После инкубации в течение необходимого времени связанный комплекс отделяется от несвязанного антигена за счет декантирования и аспирации. Ферментная активность фракции, связанной с антителами, прямо пропорциональна концентрации нативного антигена. При использовании различных референсных сывороток с известной концентрацией антигена, можно построить кривую зависимости

концентрации и ОП, затем по ней определить концентрацию в тестируемых образцах.

РЕАГЕНТЫ

Поставляемые материалы:

А. Калибратор СК-МВ - 1,0 мл во флаконе - значки А-Ф

Шесть флаконов с различными референсными концентрациями СК-МВ антигена 0 (А), 5 (В), 25 (С), 50 (D), 200 (Е) и 400 (F) в нг/мл. Растворите содержимое флаконов в 1.0 мл дистиллированной или деионизированной воды. Разведенные калибраторы стабильны 7 дней при 2-8°C. Для более длительного хранения аликвотируйте и заморозьте при -10°C.

ЗАМОРАЖИВАТЬ И ОТТАИВАТЬ СТАНДАРТЫ ДОПУСКАЕТСЯ ТОЛЬКО ОДИН РАЗ В образцы добавлены консерванты.

Примечание: Стандарты основаны на человеческой сыворотке и были прокалброваны с использованием гравиметрического метода определения веса очищенного препарата белка (>99%, как показано с помощью PAGE).

В. СК-МВ Ферментный реагент (LN Enzyme Reagent) - 13 мл во флаконе - значок €

Один флакон, содержащий антитела, меченные ферментом, биотинилированные моноклональные мышьяные IgG антитела в буфере, окрашенные, с консервантом. Хранить при 2-8°C.

С. Микропланшет, дно лунок покрыто стрептавидином (Streptavidin Coated Plate) - 96 лунок – значок ⇒

Один 96-луночный микропланшет, дно лунок которого покрыто стрептавидином, запечатан в металлизированный пакет из алюминиевой фольги с осушителем. Хранить при 2-8°C.

Д. Концентрат промывающего буфера (Wash Solution) - 20 мл - значок ♣

Один флакон, содержащий сурфактант в солевом буфере. Содержит консерванты. Хранить при 2-8°C.

Е. Субстратный реагент А (Substrate Reagent A) - 7 мл - значок S^A

Один флакон, содержащий тетраметилбензидин (ТМБ) в буфере. Хранить при 2-8°C. См «Подготовка реагентов».

Г. Субстратный реагент В (Substrate Reagent B) - 7 мл - значок S^B

Один флакон, содержащий перекись водорода в буфере. Хранить при 2-8°C. См «Подготовка реагентов».

Г. Стоп-раствор (Stop Solution) - 8 мл - значок Ⓢ

Один флакон, содержащий сильную кислоту. Хранить при 2-30°C.

Н. Инструкция по применению продукта.

Замечание 1. Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.

Замечание 2. Избегайте длительного воздействия света и тепла. Открытые реагенты стабильны 60 дней при

хранении от 2 до 8 °С. Срок годности компонентов набора указан на этикетке.

Замечание 3. Реагентов хватает для проведения анализа в одном 96-луночном микропланшете.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ

1. Микродозаторы на 25 мкл и 50 мкл с точностью не менее 1.5%.
2. Диспенсеры на 100 и 350 мкл с точностью не менее 1.5%.
3. Микропланшетный вошер или сжимаемая бутылка для промывки (опционно).
4. Микропланшетный ридер с фильтрами 450 и 620 нм (фильтр 620 нм опционный)
5. Фильтровальная бумага для высушивания лунок микропланшета.
6. Пластиковая пленка или крышка для инкубации.
7. Вакуумный осушитель для этапов промывки (опционно).
8. Таймер.
9. Емкость для хранения промывочного буфера.
10. Дистиллированная вода.
11. Контрольные материалы.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Набор предназначен только для *in vitro* диагностики.

Не для внутреннего или наружного использования на людях или животных.

Используемая для изготовления компонентов набора человеческая сыворотка протестирована на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, HCV и поверхностного антигена гепатита В с использованием реагентов, одобренных FDA, при этом получены отрицательные результаты. Однако, поскольку не существует методов, дающих полную гарантию отсутствия данных инфекционных агентов, с реагентами следует обращаться с осторожностью, как с потенциально опасным биоматериалом, способным переносить заболевания. Процедуры по хорошей лабораторной практике и работе с препаратами крови можно найти в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2nd Edition, 1988, NHS Publication No. (CDC) 88-8395 Центра по контролю за заболеваниями/Национального института здоровья.

Утилизация компонентов тест-набора должна проводиться в соответствии с государственными и федеральными нормативными.

СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Образцами служит кровь, сыворотка. При проведении венопункции и собирании образцов должны соблюдаться обычные меры предосторожности. Для правильного сравнения нормальных значений должна быть получена утренняя сыворотка крови (натощак). Для отделения сыворотки кровь следует собирать в пробирки с красной маркировкой без добавок или антикоагулянтов.

Позвольте крови свернуться. Для отделения сыворотки центрифугируйте образцы.

Образцы могут храниться при 2-8°C до 5 дней. Если образцы не могут быть протестированы за это время, они могут быть заморожены до -20°C на период до 30 дней. Избегайте использования контаминированного оборудования. Избегайте повторных циклов замораживания – оттаивания образцов. Для анализа в дублях потребуется 0.50 мл (50 мкл) разведенной сыворотки.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна использовать контроли низкого, нормального и высокого уровней для мониторинга правильности полученных результатов. Эти контроли должны исследоваться как неизвестные образцы в каждой постановке анализа. Должны строиться карты контроля качества для отслеживания характеристик поставляемых реагентов. Следует применять приемлемые статистические методы для установления отклонений. Значительные отклонения от установленных характеристик могут свидетельствовать об изменениях в условиях эксперимента или разложении реагентов набора. Для определения причины изменений должны быть использованы свежие реагенты.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ.

1. **Промывающий буфер.** Разведите содержимое концентрата промывочного буфера до 1000 мл дистиллированной или деионизированной водой в подходящей лабораторной посуде. Можно хранить при 2-30°C в течение 60 дней.
2. **Рабочий раствор субстрата.** Внесите содержимое флакона, обозначенного «раствор А», во флакон с содержимым, обозначенный «раствор В». Закройте флакон с рабочим раствором субстрата желтой крышкой для легкой идентификации. Перемешайте и промаркируйте соответствующим образом. Храните при 2-8°C.

Замечание 1: не используйте рабочий раствор субстрата при наличии голубого окрашивания.

Замечание 2: Не используйте реагенты с признаками контаминации или бактериального роста.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

Перед началом анализа все реагенты, стандарты и контроли должны достичь комнатной температуры (20-27°C).

Процедура анализа должна выполняться квалифицированным специалистом или обученным персоналом.

1. Выберите необходимое количество лунок для образцов, стандартов и контролей для проведения анализа в дублях. Верните неиспользуемые стрипы обратно в металлизированный пакет, закройте и храните при 2-8°C.

2. Внесите по 0.025 мл (**25 мкл**) референсных сывороток, контролей или тестируемых образцов в соответствующие лунки.
3. Внесите по **100 мкл СК-МВ ферментного реагента** во все лунки. Очень важно вносить все реагенты близко ко дну покрытых лунок.
Замечание: Используйте многоканальную пипетку для быстрого внесения СК-МВ ферментного реагента, чтобы избежать дрейфа, в случае, если пипетирование займет более нескольких минут.
4. Осторожно встряхните микропланшет в течение 20-30 секунд и накройте его пластиковой крышкой.
5. Инкубируйте микропланшет 15 минут при комнатной температуре (20-25°C).
6. Удалите содержимое лунок декантированием или аспирацией. Если использовалось декантирование, высушите лунки микропланшета на фильтровальной бумаге.
7. Внесите **350 мкл** промывающего буфера (см. раздел «Приготовление реагентов») и удалите его. Повторите процедуру еще два раза (общее количество циклов промывки - 3). Для этой процедуры лучше использовать автоматический или ручной вошер в соответствии с инструкциями производителя приборов (избегайте образования воздушных пузырьков). При использовании сжимаемой бутылки заполняйте каждую лунку до края сжиманием бутылки. Удалите промывающий буфер и повторите процедуру еще 2 раза.
8. Внесите по **100 мкл субстратного раствора** в каждую лунку. Всегда вносите реагенты в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать различий во времени реакции в разных лунках. Не встряхивайте микропланшет после внесения субстратного раствора!
9. Инкубируйте 15 мин при комнатной температуре.
10. Остановите развитие окрашивания добавлением в каждую лунку по 0.050 мл (50 мкл) стоп-раствора и перемешайте аккуратно в течение 15-20 секунд. Измерьте величины оптической плотности содержимого лунок при 450 нм (используйте референсную длину волны 620-630 нм для минимизации неточности лунок) на микропланшетном ридере. Измерения должны быть проведены в течение 30 минут после внесения стоп-раствора.
Внимание: Всегда вносите реагенты в одной и той же последовательности и с одинаковой скоростью, чтобы избежать различий во времени реакции в разных лунках.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для определения концентрации СК-МВ в тестируемых образцах используется калибровочная кривая.

1. Запишите значения оптической плотности для всех лунок как показано на примере 1.
2. Для построения калибровочной кривой на линейной графической бумаге используйте каждую из двух

оптических плотностей для каждого стандарта в зависимости от концентрации СК-МВ в нг/мл (не рассчитывайте среднего значения до построения).

3. Постройте наиболее оптимальную калибровочную кривую.
4. Чтобы определить концентрацию СК-МВ в неизвестных образцах, найдите среднее абсорбции в дублях для каждого неизвестного образца на вертикальной оси графика, отметьте точку пересечения на кривой и определите концентрацию (в нг/мл) по горизонтальной оси графика (как указано, значения в дублях неизвестных образцов могут быть усреднены). На следующем примере: средняя абсорбция (0,136 ОП) пересекает кривую доза-ответа на концентрации СК-МВ 12,4 нг/мл (см. Рис. 1).

Замечание. Для анализа данных может быть использовано программное обеспечение, предназначенное для ИФА анализа. Если такое программное обеспечение используется, необходимо провести валидацию данного программного обеспечения.

ID образца	№ лунки	ОП (А)	ОП среднее (В)	Среднее (Ед/мл)
Кал А	A1	0.022	0.022	0
	B1	0.023		
Кал В	C1	0.072	0.071	5
	D1	0.070		
Кал С	E1	0.243	0.236	25
	F1	0.230		
Кал D	G1	0.851	0.833	100
	H1	0.815		
Кал E	A2	1.503	1.504	200
	B2	1.505		
Кал F	C2	2.567	2.612	400
	D2	2.658		
Контроль 1	E2	0.046	0.049	2.35
	F2	0.052		
Контроль 2	G2	0.585	0.592	70.3
	H2	0.598		
Пациент	A3	0.140	0.136	12.4

B3	0.131	
----	-------	--

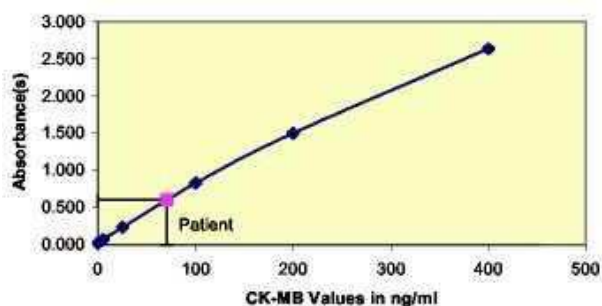


Рисунок 1.

Замечание: Данные, представленные в примере 1 и на рис.1 приведены только для иллюстрации и **не должны** использоваться для построения калибровочной кривой.

КРИТЕРИИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Для того, чтобы при проведении контроля качества результаты расценивались как правильные, необходимо соблюдение следующих критериев:

1. Оптическая плотность Калибратора «А» ≥ 0.1
2. Оптическая плотность Калибратора «F» ≤ 1.3
3. Четыре из шести контролей качества должны укладываться в установленные интервалы.

АНАЛИЗ РИСКА

Данные по безопасности материалов, входящих в состав набора и риску их использования предоставляются по запросу.

А. Качество постановки

1. Для воспроизводимости результатов важно, чтобы время инкубации было постоянным для каждой лунки.
2. Время внесения образцов не должно превышать 10 минут.
3. Не используйте для анализа липемичные, гемолизированные образцы и образцы с признаками контаминации.
4. Если для анализа используется больше, чем один микропланшет, рекомендуется повторно тестировать калибраторы и строить калибровочную кривую.
5. Внесение раствора субстрата инициирует кинетическую реакцию, которая останавливается при внесении стоп-раствора. Следовательно, внесение субстрата и стоп-раствора должно проводиться в одинаковой последовательности и с одинаковой скоростью для устранения различий во времени реакции в разных лунках.

6. Измерение оптической плотности на микропланшетном ридере проводите вертикально. Не касайтесь дна лунок микропланшета.
 7. Плохая промывка лунок может приводить к получению неточных, плохо воспроизводимых результатов.
 8. Все компоненты набора должны быть одного лота и должны храниться в одинаковых условиях. Не смешивайте реагенты из разных лотов.
 9. Образцы пациентов с концентрациями СК-МВ выше 400 нг/мл могут быть разведены с помощью нулевого калибратора и повторно протестируйте. Чтобы получить скорректированное содержание умножьте полученные значения, на коэффициент разведения.
 10. Аккуратно и точно вносите реагенты, соблюдайте время и температуру инкубаций, указанные в инструкции. В противном случае могут быть получены неточные результаты.
 11. При проведении анализа соблюдайте рекомендации, представленные в национальных руководствах, документах, законах, соблюдайте правила надлежащей лабораторной практики. Убедитесь в том, что оборудование используется должным образом.
 12. Очень важно регулярно проводить калибровку всех приборов, например дозаторов, ридера, вошера и другого оборудования, используемого для проведения анализа. Регулярно проводите профилактическое техническое обслуживание приборов.
 13. Данные по риску и безопасности продукции, производимой Monobind, и риску их использования, в соответствии с требованиями для *in vitro* диагностики 98/79/ЕС, предоставляются по требованию (Monobind@monobind.com).
- #### **В. Интерпретация результатов**
1. Измерение и интерпретация результатов должна выполняться квалифицированным специалистом или обученным персоналом.
 2. Тактика лечения и ведения пациента не может быть выбрана на основании только результатов лабораторного анализа, особенно, если есть несоответствие с другими данными.
 3. При оценке валидности результатов уровни в подходящих контрольных материалах и другие параметры должны быть в пределах указанных значений.
 4. Monobind не несет ответственности за получение неточных результатов, связанное с использованием компонентов набора разных лотов и неправильную интерпретацию результатов.
 5. Если при обработке результатов анализа используется программное обеспечение, то рассчитываемые значения стандартов не должны отклоняться более,

чем на 10% от установленных значений концентрации.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Концентрации СК-МВ выше в плазме чем в сыворотке, таким образом предпочтительно использовать сыворотку. По сравнению со значениями натошак у людей, не страдающих ожирением и не больных диабетом, уровни СК-МВ выше у тучных людей не больных диабетом и ниже у тренированных спортсменов.

Каждая лаборатория должна установить свой собственный диапазон нормальных и абнормальных значений. Эти диапазоны всегда зависят от локализации, популяции, лаборатории, техники и специфичности метода.

Основываясь на клинических данных, собранных Mopobind, в соответствии с опубликованной литературой, были установлены следующие диапазоны. Эти диапазоны должны быть использованы только как ориентировочные:

Взрослые (норма)	2.0 - 5.2 нг/мл
------------------	-----------------

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

А. Воспроизводимость

Воспроизводимость данного набора *AccuBind™ СК-МВ ELISA* для определения концентрации СК-МВ внутри серии и между сериями определялась при анализе пула контрольных сывороток трех разных уровней. Число измерений, среднее значение, стандартное отклонение (σ) и коэффициент вариации для этих сывороток приведены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2.

Воспроизводимость внутри серии (значения в мМЕ/мл)

Образец	N	X	σ	C.V., %
Уровень 1	20	0.82	0.07	8.53%
Уровень 2	20	12.11	0.59	4.87%
Уровень 3	20	58.10	3.74	6.44%

Таблица 3.

Воспроизводимость между сериями* (значения в мМЕ/мл)

Образец	N	X	σ	C.V., %
Уровень 1	20	0.86	0.09	10.4%
Уровень 2	20	13.31	1.22	9.16%
Уровень 3	20	52.52	2.84	5.45%

*Измерения проводили в 10 экспериментах, в течение 10 дней.

С. Чувствительность

Чувствительность (предел определения) был установлен определением вариабельности калибратора 0 нг/мл с использованием 2σ (95% достоверность) статистики для расчета минимальной концентрации. Чувствительность метода составила 0.182 нг/мл.

В. Точность

Данный метод *AccuBind™ СК-МВ ELISA* сравнивался с референсным радиоиммунным методом. Использованы биологические образцы популяции (симптоматической и бессимптомной). (Значения варьировали от N/D до 86

нг/мл). Общее количество таких образцов составило 124. Полученные данные представлены в таблице 4.

Таблица 4.

Метод	Среднее (x)	Регрессионный анализ по методу наименьших квадратов	Коэффициент корреляции
Данный метод	12.52	$y=0.5477 + 0.9946(x)$	0.971
Референсный метод (x)	12.04		

Обнаружено лишь незначительное расхождение данного метода и референс-метода – средние значения были очень близкими. Уравнение регрессии и коэффициент корреляции указывают на прекрасную сходимость результатов.

Д. Специфичность

Перекрестная реактивность данного ИФА метода определения с wybranными веществами изучали добавлением влияющих веществ к сыворотке в различных концентрациях. Данная система антител не выявляет СК-ВВ или СК-ММ изоформы даже при тестировании в очень высоких концентрациях.