

# НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КРЕАТИНКІНАЗИ-МВ МЕТОДОМ ІФА

## СК-МВ Test System

Кат. №: 2925-300А

Дата випуску інструкції: 16-07-2019  
Версія: 4



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

### 1.0 ПРЕДСТАВЛЕННЯ

**Призначене використання:** Кількісне визначення концентрацій Циркулюючої Креатинкінази (МВ-ізоформа) в сироватці людини за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричний.

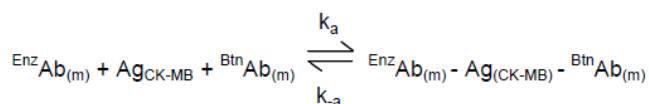
### 2.0 ВСТУП (Див. оригінал інструкції).

### 3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

#### Імуноферментний аналіз (ТИП 3)

Реагенти, необхідні для імуноферментного визначення, включають в надлишку високоафінні і специфічні антитіла (фермент-мічені і біотинильовані) для специфічного розпізнавання різних епітопів, і природний антиген. У процесі аналізу на поверхні мікролунок взаємодіють сорбовані в осередках стрептавідин і додані біотинильовані моноклональні антитіла до Креатинкінази-МВ.

При змішуванні моноклональних біотинильованих антитіл, ферментного кон'югата і сироватки, що містить природний антиген, між нативним антигеном і антитілами відбувається реакція без конкуренції або просторових утруднень з утворенням розчинного сендвіч-комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$  = Біотинильовані моноклональні антитіла (надлишкова кількість)

$\text{Ag}_{(\text{СК-МВ})}$  = Нативний антиген (змінна кількість)

$\text{EnzAb}_{(m)}$  = ферментно-мічене антитіло (надлишкова кількість)

$\text{EnzAb}_{(m)} - \text{Ag}_{(\text{СК-МВ})} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$  = Сендвіч-комплекс антиген-антитіло (змінна кількість)

$k_a$  = Константа швидкості асоціації

$k_{-a}$  = Константа швидкості дисоціації

Одночасно утворюється комплекс в лунках при реакції стрептавідину і біотинильованих антитіл. Ця взаємодія ілюструється так:



Стрептавідин<sub>c.w.</sub> = Стрептавідин, нанесений в лунки

Імобілізований комплекс = Імунний комплекс, зв'язаний з поверхню лунок.

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від не зв'язаних антигенів декантацією або промиванням. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.

### 4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

- A. Калібратори Креатинкінази-МВ - 1.0 мл (мл)/флакони (ліофілізовані)**  
Шість (6) пробірок референсного матеріалу для антигену Креатинкінази-МВ з рівнями 0 (A), 5 (B), 25 (C), 100 (D), 200 (E) і 400 (F) нг/мл (ng/ml). Розчиніть вміст кожного флакона в 1.0 мл (мл) дистильованої або деіонізованої води.  
Відновлені калібратори стабільні 7 днів при 2-8 °C (°C). Для тривалішого зберігання аліквотуйте відновлені калібратори в кріопробірки і зберігайте їх при -10 °C (°C). **ЗАБОРОНЯЄТЬСЯ ЗАМОРОЖУВАТИ БІЛЬШЕ ОДНОГО РАЗУ.** Містять консервант.
- B. Ферментний реагент Креатинкінази-МВ - 13 мл (мл)/флакони**  
Один флакон, що містить фермент-мічені очищені антитіла, та біотинильовані моноклональні мишачі IgG в буфері, з барвником і консервантом. Зберігати при 2-8 °C (°C).
- C. Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лунок**  
Один 96-лунковий мікропланшет, покритий Стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C (°C).
- D. Концентрат розчину для промивання - 20 мл (мл)/флакони**  
Один флакон, що містить ПАР в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).
- E. Субстрат А - 7.0 мл (мл)/флакони**  
Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).
- F. Субстрат В - 7.0 мл (мл)/флакони**  
Один флакон, що містить перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).
- G. Стоп-розчин - 8.0 мл (мл)/флакони**  
Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °C (°C).
- H. Інструкція**

**Зауваження 1:** Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

**Зауваження 2:** Уникайте впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °C (°C). Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

**Зауваження 3:** Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

#### 4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Дозатор, здатний подавати об'єми 0.025 мл (мл) (25 мкл (μl)) та 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Диспенсер(и) для повторної подачі об'ємів 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) та 0.350 мл (мл) (350 мкл (μl)) з точністю до 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Поліетиленова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контейнер(и) для реагентів.
10. Дистильована або деіонізована вода.
11. Контрольні матеріали.

#### 5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки для діагностики in-vitro  
Не для внутрішнього або зовнішнього використання  
на людях або тваринах**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, ВГС і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з безпеки або, наприклад, в «Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories» 2nd Edition, 1988, NHS.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна відповідати вимогам місцевої регуляторної та нормативної бази.

## 6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служить кров, сироватка за типом. Необхідно дотримуватися звичайних застережних заходів. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натщесерце). Кров слід збирати в пробірки з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

У пацієнтів, які отримують терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг (mg)/добу), не слід брати зразки принаймні до 8 годин після останнього введення біотину, бажано на ніч для забезпечення зразка натще.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C (°C) до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C (°C) на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання. Для аналізу в дублях вимагається 0.050 мл (ml) зразка.

## 7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контрольні на низькому, середньому і високому рівнях для моніторингу проведення тесту. Ці контролю повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що поставляються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

## 8.0 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

### 1. Промивний розчин

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл (ml) дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C (°C)) до 60 днів.

### 2. Робочий Субстратний розчин

Змішайте Субстрати, виливши вміст бурштинового флакона з Субстратом А у прозорий флакон з Субстратом В. Закрийте прозорий флакон жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть відповідно. Розчин зберігається при 2-8 °C (°C).

**Зауваження 1:** Не використовуйте субстрат, якщо він придбав блакитне забарвлення.

**Зауваження 2:** Не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерій.

## 9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, сироваткові референсні калібратори і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C (°C)).

**\*\*Процедура тестування повинна проводитись кваліфікованим фахівцем\*\***

- Відформатуйте лунки мікропланшетів для кожного калібратора, контролю та зразка пацієнта для аналізу у двох примірниках. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
- Додайте піпеткою по 25 мкл (µl) калібратора, контролю та зразка пацієнта у відповідні лунки.
- Додайте по 100 мкл (µl) Ферментного реагенту Креатинкінази-МВ в кожну лунку. Дуже важливо додавати всі реагенти на дно лунки.  
**Примітка:** Використовуйте багатоканальну піпетку, щоб швидко внести Ферментний Реагент, щоб уникнути дрейфу, якщо дозування триває більше, ніж кілька хвилин.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування і накрийте його.
- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі (20-25 °C (°C)).
- Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
- Додайте 350 мкл (µl) промивного буфера (див. розділ «Приготування реагентів») і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується пляшка під тиском, наповнити кожну лунку до верха (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
- Додайте по 100 мкл (µl) Робочого розчину субстрату в кожну лунку (див. «Приготування реагентів»). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же

послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

### НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожну лунку 50 мкл (µl) стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд. Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

**Примітка:** Завжди додайте реагенти в тому ж порядку, щоб мінімізувати різницю часу реакції між лунками.

## 10.0 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для визначення концентрації Креатинкінази-МВ в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть поглинання, отримане з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожну з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації Креатинкінази-МВ в нг/мл (ng/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації Креатинкінази-МВ в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 0.136 перетинає стандартну криву при 12.4 нг/мл (ng/ml) (див. мал.1)

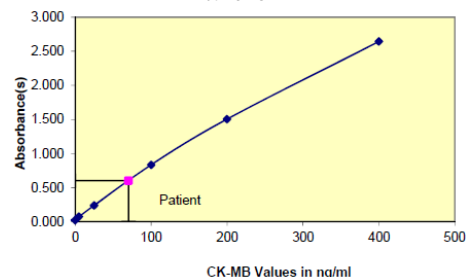
**Примітка:** Для аналізу даних може використовуватися комп'ютерне програмне забезпечення, розроблене для аналізу ІФА. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід виконати перевірку програмного забезпечення.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація (нг/мл (ng/ml))
Калібратор А	A1	0.022	0.022	0
	B1	0.023		
Калібратор В	C1	0.072	0.071	5
	D1	0.070		
Калібратор С	E1	0.243	0.236	25
	F1	0.230		
Калібратор D	G1	0.851	0.833	100
	H1	0.815		
Калібратор E	A2	1.503	1.504	200
	B2	1.505		
Калібратор 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		
Зразок	A3	0.140	0.136	12.4
	B3	0.131		

\*Дані наведені в Прикладі 1 та на Малюнку 1 тільки для ілюстрації і не повинні використовуватися для побудови стандартної кривої.

Малюнок 1



Absorbance(s) - Абсорбція(i)  
CK-MB Values in ng/ml - Значення Креатинкінази-МВ в нг/мл  
Patient - Пацієнт

## 11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Оптична щільність калібратора  $A \leq 0.075$ .
2. Оптична щільність калібратора  $F \geq 1.3$ .
3. Чотири з шести контролів якості повинні укладатися в встановлені інтервали.

## 12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма MSDS та аналізу ризиків для цього продукту доступна за запитом від Monobind Inc.

### А. Якість роботи набору

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Зразки пацієнтів з концентраціями Креатинкінази-МВ вище 400 нг/мл (ng/ml) розвести нульовим калібратором і аналізувати повторно. Результат помножити на фактор розведення.
10. Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
11. Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
12. Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
13. Аналіз ризиків - відповідно до вимог Директиви 98/79/ЄС IV маркованих IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою з [Monobind@monobind.com](mailto:Monobind@monobind.com).

### В. Інтерпретація результатів

1. Вимірювання та інтерпретація результатів повинні бути виконані кваліфікованим професіоналом.
2. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. Реагенти для процедур тестової системи були сформульовані для усунення максимальних перешкод; однак, потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та випробувальними реагентами може призвести до помилкових результатів. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемами для всіх видів імунологічних аналізів (Boscato LM, Stuart MC. «Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays» Clin.Chem. 1988: 3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні використовуватися в комбінації з клінічним оглядом, історією хвороби та всіма іншими клінічними висновками.
4. Для отримання дійсних результатів адекватні контролі та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
5. **Monobind не несе відповідальності** за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
6. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

## 13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Значення Креатинкінази-МВ в плазмі вище, ніж в сироватці; таким чином, використанню сироватки надається перевага. У людей, які не страждають діабетом, значення Креатинкінази-МВ натщесерце найбільш високі у людей, страждаючих ожирінням, а у тренуваних спортсменів - найнижчі.

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даної популяції «нормальних» людей з використанням даного методу залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень. Ґрунтуючись на клінічних дослідженнях, проведених компанією Monobind, і відповідно до опублікованих даних, було отримано наступний діапазон нормальних значень. **Даний діапазон повинен бути використаний тільки як орієнтовний:**

<b>Дорослі (нормальні значення)</b>	2.0 -5.2 нг/мл (ng/ml)
-------------------------------------	------------------------

## 14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

### 14.1 Точність

Точність Тест-системи Креатинкінази-МВ AccuBind® ІФА всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів контрольних сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2

Точність в аналізі для Креатинкінази-МВ (нг/мл (ng/ml))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Пул 1	20	0.82	0.07	8.53
Пул 2	20	12.11	0.59	4.87
Пул 3	20	58.10	3.74	6.44

ТАБЛИЦЯ 3

Точність між аналізами\* для Креатинкінази-МВ (нг/мл (ng/ml))

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Пул 1	20	0.86	0.09	10.4
Пул 2	20	13.31	1.22	9.16
Пул 3	20	52.52	2.84	5.45

\*Вимірювання проводились в 10 експериментах в дублях.

### 14.2 Чутливість

Чутливість (межа визначення) була отримана визначенням мінливості сироваткового калібратора 0 нг/мл (ng/ml) та з використанням статистики 2σ (σ - Стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі. Чутливість методу склала для Креатинкінази-МВ 0.182 нг/мл (ng/ml).

### 14.3 Достовірність

Тест-систему Креатинкінази-МВ AccuBind® ІФА порівнювали з затвердженим радіоімунним методом. Використовувалися зразки сироваток від симптоматичної та безсимптомної популяції (значення в діапазоні від не визначеного до 86 нг/мл (ng/ml)). Загальна кількість зразків склала 124. Отримані дані наведені в таблиці 4.

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Monobind (y)	12.52	$Y = 0.5477 + 0.9946(x)$	0.971
Референсний (x)	12.04		

Тільки незначна розбіжність даного методу і референсного методу була виявлена, що доводять близькі середні значення. Рівняння регресії і коефіцієнт кореляції показують прекрасну узгодженість методів.

### 14.4 Специфічність

Перехресну реактивність методу Креатинкінази-МВ AccuBind® ІФА з вибраними речовинами вивчали додаванням інтерферуючих речовин до сироваткової матриці в різних концентраціях. Перехресна реактивність оцінювалася розрахунком відношення дози інтерферуючої речовини до дози Креатинкінази-МВ, необхідної для одержання тієї ж абсорбції.



## ВИРОБНИК

MONOBIND INC.  
100 North Pointe Dr.  
Lake Forest, CA 92630 - USA  
Phone: 949.951.2665  
Fax: 949.951.3539  
[www.monobind.com](http://www.monobind.com)

МОНОБАЙНД ІНК  
100 Норд Поінт Драйв  
Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США  
Тел.: 949.951.2665  
Факс: 949.951.3539  
[www.monobind.com](http://www.monobind.com)



## УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»  
вул. Симона Петлюри, 25  
м. Івано-Франківськ, 76014  
тел.: +38 (0342) 775 122  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

