

МИОГЛОБИН

НАБОР ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Иммуноферментный метод для количественного определения миоглобина в человеческой сыворотке.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор Mioglobin ELISA предназначен для количественного определения Миоглобина в человеческой сыворотке.

II. ВВЕДЕНИЕ

Миоглобин – это белок гема, имеет молекулярную массу около 17500 Да, обнаруживается как в скелетных, так и в сердечных мышцах. Поражения любого типа мышц, сопровождающиеся такими условиями, как травма, ишемия, заболевания, являющиеся причиной миопатии, ассоциированы с выбросом миоглобина в сыворотку крови (1,2). В особенности при некрозе сердечной мышцы, ассоциированном с инфарктом миокарда (ИМ), миоглобин является одним из маркеров, уровень которых повышается по сравнению с нормальным. Измеряемый уровень миоглобина повышается по сравнению с базовой линией в течение 2-4 часов после инфаркта, достигает пика через 9-12 часов и возвращается к базовому в течение 24-36 часов (1, 3-5).

В отсутствие травмы скелетных мышц или других факторов, ассоциированных с не относящимся к ИМ увеличением циркулирующего миоглобина, его концентрация использовалась в качестве раннего маркера ИМ (4,6,7). Многочисленные сообщения предлагают использование измерений миоглобина в диагностических целях при установлении ИМ (5,8). В 100% случаев показано отрицательное прогностическое значение при измерении в определенный период после проявления симптомов (9-15). В отличие от других ферментов сердечной мышцы, таких как, например, креатинкиназа, или изофермент креатинкиназы - креатинкиназа скелетных мышц (СК, СК/МВ), уровень которых в сыворотке крови не повышается в течение достаточно длительного периода после ИМ (около 19 часов), пик повышения уровня миоглобина ожидается уже через 6-9 часов (16).

Набор Mioglobin ELISA дает возможность быстрого и надежного количественного измерения Миоглобина в сыворотке. Антитела, специально разработанные для этой тест-системы, определяют минимальную концентрацию 5.0 нг/мл, не проявляют кросс-реактивности с родственными ферментами сердечной или скелетных мышц.

III. ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный тест основан на методе твердофазного иммуноферментного анализа (17,18). В методе используются уникальные моноклональные антитела к определенной антигенной детерминанте молекулы миоглобина. Мышинные

моноклональные антитела к Миоглобину иммобилизованы в лунках микропланшета. Козьи антитела к Миоглобину конъюгированы с ферментом пероксидазой хрена (HRP). Образцы инкубируются одновременно с двумя типами антител, в результате чего образуется иммобилизованный комплекс, содержащий связанные с HRP антитела. После 45 минут инкубации при комнатной температуре лунки микропланшета промываются водой для удаления не связанных компонентов. В течение второй инкубации (20 минут) с субстратом тетраметилбензидином (ТМБ) развивается голубая окраска. Развитие окраски останавливается добавлением стоп-раствора (1 Н соляная кислота), при этом цвет изменяется на желтый. Концентрация Тропонина I прямо пропорциональна интенсивности окрашивания. Абсорбция измеряется спектрофотометрически при длине волны 450 нм.

IV. РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

1. *Микропланшет, покрытый антителами* (96 ячеек в одном планшете).

Микропланшет покрыт мышиными моноклональными антителами к Миоглобину.

2. *Панель стандартов* (1 панель в наборе, 1.0 мл в одном флаконе)

Содержит стандарты 0, 25, 100, 250, 500 и 1000 нг/мл Миоглобина, в жидком виде, готовы к использованию. **Эти стандарты уже были разведены в 10 раз, пожалуйста, не разводите их еще раз!**

3. *Буфер для разведения образцов* (25 мл во флаконе)

Содержит бычий сывороточный альбумин и 1.0% (масса/объем) Pro-Clin в качестве консерванта.

4. *Конъюгат фермента* (22 мл во флаконе)

Содержит антитела к Миоглобину, конъюгированные с ферментом пероксидазой хрена в Tris-буфере, содержащем БСА и консерванты.

5. *Субстрат ТМБ* (11 мл во флаконе)

Содержит раствор ТМБ, готовый к использованию

6. *Стоп-раствор* (11 мл во флаконе)

Содержит разбавленную соляную кислоту (1 Н HCl, готов к использованию).

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Калиброванные пипетки переменного объема на 20 мкл, 50 мкл 200 мкл и 1.0 мл
- Одноразовые наконечники
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм
- Вортекс или его аналог
- Фильтровальная бумага
- Миллиметровая бумага или программное обеспечение для обработки результатов

V. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы с отрицательными результатами методами, одобренными FDA, на наличие HBsAg, HIV 1/2, HCV. Однако, ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами сыворотки крови пациентов следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными. Рекомендуется работать с образцами сывороток пациентов и реагентами набора согласно рекомендациям Стандарта OSHA (19) или в соответствии с национальными стандартами и руководствами, регулирующими работу с биоопасными материалами (20-21).

- Избегайте контактов с 1N соляной кислотой, они могут вызывать раздражения кожи и ожоги. При попадании стоп-раствора на кожу промойте место контакта большим количеством воды. При возникновении раздражений и ожогов обращайтесь за медицинской помощью.
- Не используйте реагенты с истекшим сроком хранения и не смешивайте разные лоты и реагенты из разных лотов
- Закрывайте флаконы немедленно после использования реагентов. Не меняйте крышки флаконов.
- Не пипетируйте ртом
- Только для диагностики *in vitro*

VI. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

- Храните невскрытые компоненты набора при температуре 2-8°C с моменты получения и до использования, но не позже срока годности, указанного на этикетке набора.
- Храните микропланшет в закрытом пакете с осушителем, сведите к минимуму контакт с сырým воздухом.

VII. ОБОРУДОВАНИЕ

Для считывания оптической плотности необходим микропланшетный ридер с шириной полосы пропускания 10 нм или меньше, с диапазоном измеряемой оптической плотности (ОП) от 0 до 3 ед. ОП и с фильтром на 450 нм.

VIII. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Все реагенты должны достичь комнатной температуры (18-25°C) перед использованием.
- **Образцы сыворотки пациентов и контрольные сыворотки должны быть разведены в 10 раз перед использованием. Приготовьте серию микропробирок – например, микроцентрифужные пробирки на 1.5 мл – и смешайте в них по 20 мкл образца сыворотки пациента или контрольной сыворотки и 180 мкл (0.18 мл) Буфера для разведения образцов. Пожалуйста, не разводите стандарты, они уже были разведены в 10 раз!**
- Пробы, в которых значения концентрации Миоглобина ожидаются выше 1000 нг/мл можно протестировать, предварительно разведя их Буфером для разведения образцов

IX. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

- Данный метод предназначен для анализа образцов сыворотки.
- Образцы крови могут быть собраны обычной венопункцией. Отделите сыворотку от коагулята и клеток крови не позднее, чем через 60 минут после сбора образца.
- Образцы могут храниться перед анализом при температуре 2-8°C в течение 24 часов. Если образцы будут проанализированы позже, их необходимо заморозить до температуры -20°C или ниже. В замороженном виде образцы могут храниться в течение 6 месяцев.
- Избегайте использования гемолизированных (ярко-красных), липемичных (белесых) или взболтанных (после центрифугирования) образцов.
- Не допускайте повторных циклов замораживания-оттаивания образцов. Не используйте «саморазмораживающиеся» холодильники, они могут быть причиной самопроизвольного оттаивания.
- Замороженные образцы после оттаивания, также как и взболтанные образцы или образцы, содержащие частицы, необходимо центрифугировать перед анализом.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ:

- Рекомендации по пипетированию (одноканальной или многоканальной пипеткой): Пипетирование всех стандартов, образцов и контролей должно быть произведено в течение 3х минут
- Анализ всех стандартов, образцов и контролей должен производиться в дублях, таким образом, чтобы все условия анализа были одинаковыми.
- ОП в лунках рекомендуется считывать в течение 15 минут после добавления стоп-раствора.

X. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Образцы сыворотки пациентов и контрольные сыворотки должны быть разведены в 10 раз перед использованием. Приготовьте серию микропробирок – например, микроцентрифужные пробирки на 1.5 мл – и смешайте в них по 20 мкл образца сыворотки пациента или контрольной сыворотки и 180 мкл (0.18 мл) Буфера для разведения образцов. Пожалуйста, не разводите стандарты, они уже были разведены в 10 раз!
2. Поместите требуемое количество стрипов в держатель
3. Добавьте по 20 мкл каждого стандарта, разведенного образца или разведенного контроля в соответствующие ячейки
4. Добавьте по 200 мкл *Конъюгат фермента* в каждую лунку
5. Тщательно перемешайте в течение 30 секунд. Очень важно перемешать полностью.
6. Инкубируйте 45 минут при комнатной температуре 18-25°C
7. Полностью удалите содержимое ячеек в емкость для сбора отходов встряхиванием микропланшета.
8. Наполняйте и выливайте (встряхиванием) лунки микропланшета дистиллированной или деионизированной водой 5 раз. (Пожалуйста, не используйте воду из-под крана)
9. Ударьте несколько раз микропланшет над фильтровальной бумагой до полного удаления оставшихся капель воды.
10. Добавьте по 100 мкл раствора ТМБ в каждую лунку. Аккуратно перемешайте в течение 5 секунд.
11. Инкубируйте 20 минут при комнатной температуре.
12. Остановите реакцию добавлением 100 мкл стоп-раствора. в каждую лунку.
13. Аккуратно перемешайте в течение 30 секунд. **Важно убедиться, что весь голубой цвет во всех лунках полностью поменялся на желтый**
14. Считайте ОП при длине волны 450 нм на микропланшетном ридере **в течение 15 минут.**

XI. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Хорошая лабораторная практика требует, чтобы пробы контроля качества (контроли) анализировались при каждой постановке с каждой калибровочной кривой для подтверждения достоверности результатов.
- Для гарантии соответствующего качества контрольные материалы должны анализироваться повторно, для установки среднего значения и приемлемого диапазона.

XII. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Рассчитайте среднее значение поглощения (A) для каждого стандарта, контроля и образца 450
2. Используя графическую бумагу постройте калибровочную кривую, для этого отметьте точки сосчитанных средних значений поглощения стандартов на вертикальную ось Y, а соответствующие концентрации на горизонтальную ось X

3. Используя среднее значение поглощения для каждого образца определите соответствующую концентрацию Миоглобина (нг/мл) из стандартной кривой.

4. Так как стандарты уже были разведены в 10 раз, не нужно умножать полученные для разведенных образцов или разведенных контролей значения концентрации на коэффициент 10. Однако, если образцы были разведены в 100 раз, необходимо полученные результаты умножить на 10.

XIII. ПРИМЕР КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Результаты типичного анализа приведены на графике и в таблице. По оси У отложена ОП стандартов при длине волны 450 нм, по оси X отложена концентрация стандартов.

ЗАМЕЧАНИЕ: Данная калибровочная кривая приведена только в качестве примера и не должна использоваться для расчета результатов. Каждая лаборатория должна получать собственные данные для построения калибровочной кривой при каждом производимом анализе.

А. Стандартная калибровочная кривая:

Миоглобин	ОП (450 нм)
0	0,071
25	0,235
100	0,632
250	1,169
500	1,845
1000	3,357

XIV. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- Для успешного использования набора необходимо полное понимание вложенной инструкции. Правильные результаты будут получены только при использовании точной лабораторной техники и аккуратном выполнении инструкции.
- Результаты, полученные данным методом, должны использоваться только совместно с результатами, полученными в ходе иных диагностических процедур и информации, доступной лечащему врачу. Например, дополнительные клинические исследования, ЭКГ, симптомы, клинические наблюдения.
- Не допускайте использования сильно гемолизированных, сильно липемичных или взболтанных образцов.
- Процедура промывки критична. Неполная промывка негативно влияет на точность результатов, является причиной ложноположительных результатов.
- Образцы сыворотки пациентов могут содержать антимышьи антитела (НАМА), способные вызывать ложноположительные результаты при использовании мышинных антител. Не смотря на то, что при разработке данного метода влияние НАМА антител было сведено к минимуму, производитель не может гарантировать полное отсутствие такого влияния.
- Результаты исследования, не согласующиеся с клинической картиной и историей болезни пациента, должны интерпретироваться с осторожностью.

XV. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

- Нормальной считается концентрация миоглобина в интервале от 12 до 100 нг/мл. Уровень миоглобина несколько повышается с возрастом ²².
- Для определения ожидаемых нормальных значений с использованием данного теста был произведен анализ клинических данных. Полученный в результате исследования диапазон нормальных значений совпадает с общепринятым. Для того, чтобы установить уровень нормы, были исследованы сыворотки 83 здоровых взрослых людей, и диапазон

нормальных значений был определен как от 8.1 до 54.5 нг/мл Миоглобина.

- Каждой лаборатории рекомендуется установить собственный уровень нормальных значений при использовании метода ИФА. При диагностике ИМ должны быть приняты во внимание и другие факторы, так как различные причины, ведущие к повреждению сердечной или скелетных мышц, могут быть причиной повышенного уровня миоглобина в крови по сравнению с ожидаемым нормальным значением.

- **ЗАМЕЧАНИЕ:** Для образцов сыворотки пациентов с повышенными значениями могут потребоваться серийные разведения.

XVI. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

• Клиническая корреляция

Для определения точности данного метода по сравнению с другим коммерчески доступным набором для определения Миоглобина были проведены клинические исследования. Полученные данные приведены ниже.

Статистический анализ, проведенный с использованием 150 образцов сыворотки пациентов, с концентрацией Миоглобина в диапазоне от 3.7 нг/мл до 919.8 нг/мл, определенной с использованием данного метода (от 13 нг/мл до 1011 нг/мл при использовании Abbott Mioglobin MEIA) продемонстрировал эквивалентность с другим коммерчески доступным набором AxSym[®] Mioglobin для определения Миоглобина, как показано ниже:

Сравнение данного метода с Abbott AxSym[®] TnI тестом дало следующие результаты:

Коэффициент корреляции = 0.9392

Отклонение = 0.9948

Пересечение = 55.051

Среднее (данный метод) = 287.9 нг/мл

Среднее (Abbott AxSym[®] Mioglobin) = 262.5 нг/мл

• Чувствительность

Минимально определяемая концентрация Миоглобина данным методом = 5.0 нг/мл.

• Хук-эффект

Хук-эффект не наблюдался при анализе данным методом образцов с концентрацией Миоглобина до 10000 нг/мл.

• Воспроизводимость:

а. Внутри серии

Воспроизводимость внутри серии исследовалась путем многократного определения 5 различных образцов в одной постановке. Вариабельность внутри серии приведена ниже:

Образцы сыворотки	1	2	3	4	5
Количество реплик	20	26	26	26	26
Среднее значение сTnI	55,6	214,3	294,9	505,9	1,437
S.D. (стандартное отклонение)	2,2	12,9	16,2	26,3	94,0
C.V.(%, коэффициент корреляции)	3,9%	6,0%	5,5%	5,2%	6,6%

в. Между сериями

Воспроизводимость между сериями исследовалась путем многократного определения 5 различных образцов в нескольких индивидуально прокалиброванных постановках. Вариабельность между сериями приведена ниже:

Образцы сыворотки	1	2	3	4	5
Количество реплик	35	35	35	35	35
Среднее значение сTnI	59,2	244,4	330,5	568,3	1451,7
S.D. (стандартное отклонение)	4,6	12,8	38,9	52,7	104,7
C.V.(%, коэффициент корреляции)	7,8%	5,2%	11,8%	9,3%	7,2%

• Извлечение

Различные образцы сыворотки с известными концентрациями Миоглобина были смешаны и проанализированы в дублях. Среднее значение извлечения составило 102.8%

	Ожидаемое значение	Наблюдаемое значение	% Извлечения
1	280	250	89,3%
2	451	495	109,8%
3	255	241	94,5%
4	269	300	111,5%
5	39	41	105,1%
6	240	231	96,0%
7	92	88	95,9%
8	209	214	102,0%
9	340	328	96,0%
10	214	213	100,0%
11	551	655	118,8%
12	431	436	101,2%
13	757	824	108,8%
14	747	768	102,8%
15	780	894	114,6%
16	575	569	98,9%

• Линейность

3 образца сыворотки пациентов были серийно разведены для определения линейности. Среднее значение извлечения составило 105.8%.

Разведение				
1.	Неразведенные	----	----	----
	1:2	540	542,6	100,5%
	1:4	270	290,8	107,7%
	1:8	135	153,3	113,6%
	1:16	67,5	75,3	111,6%
	1:32	33,8	38,7	114,5%
	1:64	16,9	18,8	111,2%
	1:128	8,5	8,6	101,2%
1:256	4,3	3,9	90,7%	
Среднее = 106,4 %				
2.	Неразведенные	----	----	----
	1:2	945	956	101,2%
	1:4	472,5	500	105,8%
	1:8	236,3	262,8	111,2%
	1:16	118,1	131,7	111,5%
	1:32	59,1	65,2	110,3%
	1:64	29,5	31,1	105,4%
	1:128	14,8	12,8	86,5%
Среднее = 104,6 %				
3.	Неразведенные	----	----	----
	1:2	691,0	691,4	100,0%
	1:4	345,5	345,7	100,0%
	1:8	172,8	172,8	100,0%
	1:16	107,8	107,8	100,0%
	1:32	67,1	67,1	100,0%
	1:64	34,3	34,3	100,0%
	1:128	17,2	17,2	100,0%
1:256	8,6	8,6	100,0%	
Среднее = 106,5 %				

4. Специфичность

Следующие приведенные в таблице вещества, в концентрациях, указанных в таблице, были исследованы на

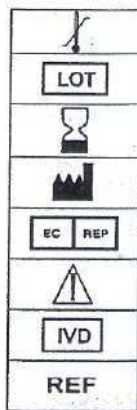
наличие перекрестной реакции. Ни для одного из них не было обнаружено перекрестной реакции.

Исследуемый материал	Концентрация
Влияющие вещества	
Тропонин I сердечной мышцы	1000 нг/мл
Тропонин T сердечной мышцы	1000 нг/мл
Тропонин C сердечной мышцы	1000 нг/мл
Тропонин I скелетных мышц	1000 нг/мл
СК-МВ	1000 нг/мл
СК-МВ2	100 нг/дл
СК-ММ	5 мг/мл
СК-ВВ	10 мг/мл
Тропомииозин	1000 нг/мл
Легкая цепь миозинкиназы	1000 нг/мл
Актин	1000 нг/мл
Эндогенные вещества	
Билирубин	20 мг/дл
Холестерин	500 мг/дл
Триглицериды	1,500 мг/дл
Общий белок	3 г/дл
Общий белок	10 г/дл
Терапевтические вещества	
Аспирин	0,3 нг/мл
Кумадин	1000 нг/мл
Дигоксин	200 нг/мл
Флюросемид (Лазикс)	400 уг/мл
Натрий гепарин	8 Ед/мл

XVII. СТАНДАРТИЗАЦИЯ

Комплекс Миоглобина человека был получен от сертифицированного производителя, концентрация Миоглобина была установлена. В дальнейшем препарат был разведен буфером для разведения образцов Миоглобина и обозначен как «Основной раствор стандарта», для приготовления референсных панелей стандартов Миоглобина. Полученное после разведения значение концентрации Миоглобина «Основного раствора стандарта» было подтверждено Abbott AxSym® Mioglobin.

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ СИМВОЛЫ



- температура хранения
- номер лота
- срок годности
- производитель
- авторизованный представитель
- внимание, см. инструкцию
- для диагностики in vitro
- номер по каталогу