

# 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. Мышиные

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 Х 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 <sup>22</sup>.
- 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<sup>®</sup> Mioglobin для определения Миоглобина, как показано ниже:

Сравнение данного метода с Abbott AxSym<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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          | 86,4  | 86,4   | 100,0% |
|                   | 1:32          | 43,2  | 43,2   | 100,0% |
|                   | 1:64          | 21,6  | 21,6   | 100,0% |
|                   | 1:128         | 10,8  | 10,8   | 100,0% |
| 1:256             | 5,4           | 5,4   | 100,0% |        |
| Среднее = 106,5 % |               |       |        |        |

#### 4. Специфичность

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

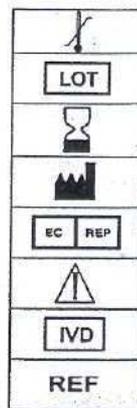
наличие перекрестной реакции. Ни для одного из них не было обнаружено перекрестной реакции.

| Исследуемый материал            | Концентрация |
|---------------------------------|--------------|
| <b>Влияющие вещества</b>        |              |
| 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   |
| <b>Эндогенные вещества</b>      |              |
| Билирубин                       | 20 мг/дл     |
| Холестерин                      | 500 мг/дл    |
| Триглицериды                    | 1,500 мг/дл  |
| Общий белок                     | 3 г/дл       |
| Общий белок                     | 10 г/дл      |
| <b>Терапевтические вещества</b> |              |
| 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