Набор реагентов для определения тропонина И (Troponin I ELISA)

ТРОПОНИН I (ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ КАРДИОСПЕЦИФИЧНЫЙ) НАБОР ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Иммуноферментный анализ для количественного определения Кардиоспецифичного Тропонина I в человеческой сыворотке.

I. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор cTnI ELISA предназначен для количественного определения кардиального Тропонина I в человеческой сыворотке. Определение уровня Тропонина I может быть использовано для оценки острого инфаркта миокарда (ОИМ).

II. ВВЕДЕНИЕ

Тропонин – это ингибиторный или регулирующий сокращение скелетных (поперечнополосатых) мышц белковый комплекс. Он расположен с периодичностью вдоль тонких филаментов мышц и состоит из трех различных белков: Тропонина I, Тропонина C и Тропонина T (1-5). Подобно тому, субъединица Тропонина I существует в трех изоформах. Две из них встречаются в медленных (тонических) и быстрых (фазических) волокнах скелетных мышц, а третий – в сердечной мышце (6-8). Кардиоспецифичная изоформа отличается примерно на 40%, имеет молекулярную массу около 22500 Да, и содержит дополнительно 31 аминокислотный остаток, отсутствующий в скелетных изоформах (3-4, 8-12). Антитела, распознающие эту уникальную изоформу, иммунологически отличаются от антител, распознающих скелетные изоформы (10, 13). Таким образом, уникальность изоформы и тканевая специфичность Тропонина I сердечной мышцы служит основой использования в целях диагностики острого инфаркта миокарда (ОИМ) (2-4, 8-9, 13-17).

Тропонин I сердечной мышцы (cTnI) может быть использовано для дифференциальной диагностики пациентов, поступающих по Скорой Помощи (СП) с болью в области грудной клетки (18-20). Инфаркт миокарда диагностируется тогда, когда уровни таких чувствительных и специфических маркеров, как Тропонин I, MB изофермент креатинкиназы (CK-MB, мышечная креатинкиназа) и миоглобин, повышены, на фоне клинической картины острой ишемии (21-23).

Самый новый из описанных и предпочтительный маркер миокардиального повреждения – это тропонин сердечной мышцы (I или T) (23). Тропонины сердечной мышцы проявляют высокие тканеспецифичность и чувствительность. TnI сердечной мышцы и мышечная креатинкиназа (CK-MB) имеют схожие принципы высвобождения (через 4-6 часов после появления боли), но уровень cTnI остается высоким гораздо более длительный период времени (6-10 дней), что дает возможность выявлять поражение сердечной мышцы в течении более долгого времени (23-24).

В норме концентрация cTnI в крови очень низкая. После ОИМ она значительно увеличивается в течение 4-6 часов, а пик концентрации отмечается приблизительно через 12-24 часа после инфаркта (24-28). Тот факт, что уровень cTnI в сыворотке крови остается повышенным в течение длительного времени, в совокупности с его высокой кардиоспецифичностью и чувствительностью позволяет диагностировать ОИМ намного раньше (4 часа) после приступа ишемии (1, 25), а также диагностировать периоперативный инфаркт в ситуациях, когда ожидается высокий уровень протеинов скелетных мышц (17).

Кроме того, недавние исследования выявили взаимосвязь между уровнем тропонина сердечной мышцы и долгосрочным прогнозом при эпизодическом дискомфорте в области грудной клетки (24, 29). В результате таких исследований предполагается, что использование cTnI имеет высокое прогностическое значение при выявлении группы высокого риска среди пациентов со стенокардией (30), и что эти тесты могут быть особенно полезны для оценки состояния пациента перед выпиской (25, 29, 31).

Набор cTnI ИФА дает возможность быстрого и надежного количественного измерения кардиоспецифичного Тропонина I. Антитела, специально разработанные для этой тест-системы, определяют минимальную концентрацию 1.0 нг/мл, не проявляют кросс-реактивности ни с Тропонином T сердечной мышцы, ни с Тропонином T или I скелетных мышц.

III. ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный тест основан на методе твердофазного иммуноферментного анализа. В методе используются четыре типа уникальных моноклональных антител к различным антигенным детерминантам молекулы. Три типа мышиных моноклональных антитела к Тропонину I иммобилизованы в лунках микропланшета. Четвертый тип антител коньюгирован с ферментом пероксидазой хрена (HRP). Образцы инкубируются одновременно со всеми четырьмя типами антител, в результате чего образуется иммобилизованный комплекс типа сэндвич, содержащий связанные с твёрдой фазой и HRP антитела. После 90 минут инкубации при комнатной температуре лунки микропланшета промываются водой для удаления несвязавшихся компонентов. В течение второй инкубации (20 минут) с субстратом тетраметилбензидином (ТМБ) развивается голубая окраска. Развитие окраски останавливается добавлением стоп-раствора (1 N 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. **PLA TROPONIN-I** *Микропланшет, покрытый антителами к cTnI* - 1 планшет, 96 ячеек.
2. *Панель стандартов* (1 панель в наборе, 1.0 мл во флаконе.
3. **CONJ ENZ TROPONIN-I** *Коньюгат cTnI-HRP* -13 мл во флаконе.
4. *Субстрат ТМБ* - 11 мл во флаконе.

Содержит раствор ТМБ, готовый к использованию

5. *Стоп-раствор* - 11 мл во флаконе. Содержит раствор соляной кислоты (1 N HCl).

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Дистиллированная или деионизированная вода

2. Калиброванные пипетки переменного объема на 5 мкл, 10 мкл, 50 мкл 100 мкл и 1.0 мл
3. Одноразовые наконечники
4. Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм
5. Вортекс или его аналог
6. Фильтровальная бумага
7. Миллиметровая бумага или программное обеспечение для обработки результатов
8. Контрольные материалы «кардиомаркер Tri-level control», кат. № 685 (Bio-Rad Laboratories Diagnostic Group, Hercukes, CA 94547)

V. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. 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 полностью гарантировать отсутствие этих инфекционных агентов. Следовательно, с реагентами и образцами сыворотки крови пациентов следует обращаться как с потенциально инфицированными. Рекомендуется работать с образцами сывороток пациентов и реагентами набора согласно рекомендациям Стандарта OSHA (32) или в соответствии с национальными стандартами и руководствами, регулирующими работу с биоопасными материалами (33-34).
2. Избегайте контактов с 1N соляной кислотой, она может вызывать раздражение кожи и ожоги. При попадании стоп-раствора на кожу промойте место контакта большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью в случае раздражения.
3. Не используйте реагенты с истекшим сроком хранения и не смешивайте разные лоты и реагенты из разных лотов
4. Закрывайте флаконы немедленно после использования реагентов. Не меняйте крышки флаконов.
5. Не пипетируйте ртом
6. Только для диагностики *in vitro*

VI. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

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

VII. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. Все реагенты должны достичь комнатной температуры (18-25°C) перед использованием.

2. Разбавьте каждый лиофилизированный стандарт 1 мл дистилированной воды, оставьте не менее чем на 20 минут для полного растворения и аккуратно перемешайте. *Разведенные стандарты, хранящиеся в закрытых флаконах при 2-8°C стабильны в течении 8 часов. Для максимального увеличения периода стабильности разведенных стандартов их необходимо аликвотировать и заморозить (-20°C или ниже) немедленно после разведения.* Каждая аликвота стандартов может быть заморожена и разморожена только один раз.

3. Образцы, в которых значения концентрации Тропонина I предполагаются выше 100 нг/мл можно проанализировать, предварительно разведя их буфером для разведения. Буфер для разведения можно приобрести у производителя.

VIII. 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.

IX. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

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

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ:

1. Рекомендации по дозированию (одноканальной или многоканальной пипеткой): Внесение в лунки планшета всех стандартов, образцов и контролей должно быть выполнено в течение 3-х минут
2. Анализ всех стандартов, образцов и контролей должен производится в дублях таким образом, чтобы все условия анализа были одинаковыми.
3. ОП в лунках рекомендуется считывать в течение 15 минут после добавления стоп-раствора.

X. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Поместите требуемое количество стрипов в держатель
2. Внесите по 100 мкл каждого стандарта, образца или контроля в соответствующие лунки
3. Внесите по 100 мкл раствора конъюгата cTnI-HRP во все лунки
4. Тщательно перемешайте в течение 30 секунд. Очень важно перемешать полностью.
5. Инкубируйте 90 минут при комнатной температуре (18-25°C), не закрывая планшет.
6. Полностью удалите содержимое лунок в емкость для сбора отходов встряхиванием микропланшета.
7. Наполняйте и выливайте (встряхиванием) лунки микропланшета дистилированной или деионизированной водой 5 раз. (Пожалуйста, не используйте воду из-под крана)
8. Аккуратно постучите несколько раз перевернутым микропланшетом по фильтровальной бумаге до полного удаления оставшихся капель воды.
9. Внесите по 100 мкл раствора ТМБ в каждую лунку. Аккуратно перемешайте в течение 5 секунд.
10. Инкубируйте 20 минут при комнатной температуре (18-25°C) в темноте.
11. Остановите реакцию добавлением 100 мкл стоп-раствора. в каждую лунку.

12. Аккуратно перемешайте в течение 30 секунд. *Важно убедиться, что во всех лунках голубой цвет полностью изменился на желтый.*
13. Считайте ОП при длине волны 450 нм на микропланшетном ридере **в течение 15 минут**.

XI. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Правила надлежащей лабораторной практики (GLP) требу.т, чтобы контрольные образцы анализировались в каждой постановке с каждой калибровочной кривой для подтверждения достоверности результатов. Для гарантии правильного выполнения анализаконтрольные материалы должны анализироваться повторно, для установки среднего значения и приемлемого диапазона.

XII. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Рассчитайте среднее значение абсорбции для каждого стандарта, контроля и образца при измерении с фильтром 450 нм.
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 Тропонина I (нг/мл) из стандартной кривой. В зависимости от опыта или доступности компьютерных приложений могут быть использованы другие методы расчета результатов.
4. Все образцы со значениями, большими, чем 100 нг/мл, должны быть разведены в 10 раз буфером для разведения. Буфер для разведения можно приобрести у производителя.

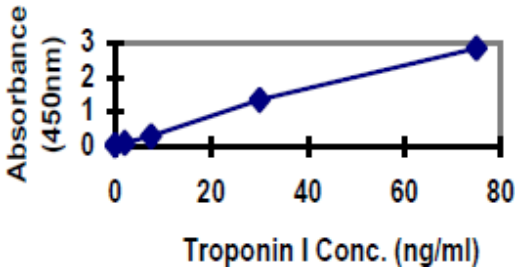
XIII. ПРИМЕР КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Результаты типичной стандартной кривой со значениями абсорбции 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 образцов. Каждая лаборатория должна получать собственные данные для построения калибровочной кривой в каждой постановке.

А. Стандартная калибровочная кривая:

cTnI (ng/ml)	ОП (450 нм)
0	0.048
2.0	0.110
7.5	0.307
30	1.357
75	2.853



XIV. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

1. Для успешного использования набора необходимо полное понимание вложенной инструкции. Правильные результаты будут получены только тогда, когда процедура анализа осуществляется с полным пониманием инструкции и с соблюдением правил надлежащей лабораторной практики.
2. 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.
3. Не допускайте использования сильно гемолизированных, сильно липемичных или мутных образцов.
4. Процедура промывки критична. Неполная промывка негативно влияет на точность результатов и является причиной ложноположительных результатов.
5. Образцы сыворотки пациентов могут содержать антимышиные антитела (HAMA), способные давать ложноположительные или ложноотрицательные результаты при использовании мышиных антител. Не смотря на то, что при разработке данного метода влияние HAMA антител было сведено к минимуму, производитель не может гарантировать полное отсутствие такого влияния.
6. Результаты исследования, не согласующиеся с клинической картиной и историей болезни пациента, должны интерпретироваться с осторожностью.

XV. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Для определения ожидаемых нормальных значений, клинической чувствительности и специфичности теста была проведена оценка клинических данных. Для установления диапазона нормальных ожидаемых значений были исследованы сыворотки 225 здоровых взрослых людей, и нормальное значение было определено как ≤0.5 нг/мл cTnI. Все значения, полученные для здоровой популяции, были ниже, чем чувствительность данного метода (1.0 нг/мл).

Каждой лаборатории рекомендуется установить собственный диапазон нормальных значений, основываясь на популяционных, географических, диетологических факторах и влиянии окружающей среды. Более того, текущая практика и клинические критерии диагностики ОИМ должны быть обоснованы. Тем не менее, на основе опубликованных данных диагностически значимый дискриминационный уровень для пациентов с ОИМ установлен на значении 1.5 нг/мл.[35]

Любые состояния, приводящие к повреждению клеток миокарда, могут потенциально увеличить уровни сердечного тропонина-I выше ожидаемого значения. Эти зарегистрированные клинические условия включают нестабильную стенокардию, миокардит, застойную сердечную недостаточность и хирургическое вмешательство или инвазивное исследование сердца.[3,29]

ПРИМЕЧАНИЕ: Для обнаружения повышенных уровней может потребоваться серийный отбор образцов.

XVI. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Для определения точности, диагностической чувствительности и специфичности данного метода по сравнению с другим коммерчески доступным набором для определения cTnI были проведены клинические исследования. Полученные данные приведены ниже.

1. Клиническая корреляция
Статистические анализ, проведенный с использованием 204 образцов сыворотки пациентов, с концентрацией cTnI в диапазоне от 0.7 нг/мл до 595 нг/мл, определенной с использованием данного метода (от 0.5 нг/мл до 484 нг/мл при использовании Abbott TnI MEIA) продемонстрировал эквивалентность с другим коммерчески доступным набором для определения cTnI, как показано ниже:

Сравнение данного метода с методом Abbott AxSym® TnI дало следующие результаты:

Коэффициент корреляции = 0.9537
Слоуп = 0.9063
Интерсепт = -3.9875
Среднее (данный метод) = 45.57 нг/мл
Среднее (Abbott AxSym® TnI) = 50.37 нг/мл

После удаления образцов, концентрация cTnI в которых превышала диапазон измерений Abbott AxSym® TnI (> 50 нг/мл), были получены следующие статистические данные (данные приведены для того, чтобы показать согласованность методов при анализе неразведенных проб).

Коэффициент корреляции = 0.8672
Слоуп = 1.0416
Интерсепт = 0.7816
Среднее (данный метод) = 9.96 нг/мл
Среднее (Abbott AxSym® TnI) = 12.72 нг/мл

2. Клиническиечувствительность и специфичность
Из всех 149 пациентов (249 образцов) в этом исследовании 93 пациента имели подтвержденный диагноз ОИМ. Используя дискриминационный уровень, равный 1.5 н/мл, была определена диагностическая чувствительность и специфичность определения cTnI. Клиническая специфичность была равна 87.5% (95% перцентиль: 80.3% - 94.7%), тогда как чувствительность составила 100%.

Результаты данного исследования продемонстрировали, что данный метод ИФА определения cTnI имеет сравнимое диагностическую точность с другим доступным в настоящее время устройством.

XVII. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. Чувствительность
Минимально определяемая концентрация, измеренная данным методом cTnI ELISA как 2xSD (стандартных отклонения) от среднего значения, полученного для нулевого стандарта, составила 1.0 нг/мл. Кроме того, была определена функциональная чувствительность = 0.75 нг/мл (при определении %CV между сериями ≤ 10%). ***Нижний предел определения cTnI ELISA ≅ 0.48 нг/мл cTnI; верхний предел = 1.0 нг/мл cTnI.***

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

3. Воспроизводимость:

а. Внутри серии
Воспроизводимость внутри серии исследовалась путем многократного определения 7 различных образцов в одной постановке. Вариабельность внутри серии приведена ниже:

Образцы сыворотки	1	2	3	4	5
Количество реплик	20	20	20	20	20
Среднее значение cTnI	1.69	5.93	24.3	44.9	89.8
S.D. (стандартное отклонение)	0.05	0.22	1.35	1.78	2.52
C.V.(%, коэффициент корреляции)	2.8	3.7	5.6	4.0	2.8

в. Между сериями
Воспроизводимость между сериями исследовалась путем многократного определения 6 различных образцов в нескольких индивидуально прокалиброванных постановках. Вариабельность между сериями приведена ниже:

Образцы сыворотки	1	2	3	4	5
Количество реплик	20	26	26	26	26
Среднее значение cTnI	1.68	5.88	24.56	48.91	85.81
S.D. (стандартное отклонение)	0.11	0.28	1.14	2.23	3.76
C.V.(%, коэффициент корреляции)	6.7	4.8	4.7	4.6	4.4

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 перекрестных реакций.

Исследуемый материал	Концентрация
Кроличий Тропонин С скелетных мышц	2500 нг/мл
Тропонин Т сердечной мышцы человека	2500 нг/мл
Тропонин Т скелетных мышц человека	2500 нг/мл
Тропонин I скелетных мышц человека	2500 нг/мл
Гемоглобин	1,2 г/дл
Билирубин	20 мг/дл
Холестерин	500 мг/дл
Триглицериды	1000 мг/дл
Общий белок	10 г/дл

5. Извлечение и линейность
а. Извлечение
Различные образцы сыворотки с известными концентрациями cTnI были смешаны и проанализированы в дублях. Среднее значение извлечения составило 93.3%.

	Ожидаемое значение	Наблюдаемое значение	% Извлечения
1	4.25	3.95	92,9%
2	8.97	8.50	94,8%
3	11.43	10.49	91,8%
4	14.97	14.00	93,5%
5	32.34	29.62	91,6%
6	32.77	30.49	93,0%
7	81.00	77.21	95,3%

в. Линейность
4 образца сыворотки пациентов были серийно разведены для определения линейности. Среднее значение извлечения составило 101.7%.

№ образца	Разведение			
1.	Неразведенные	-----	-----	-----
	1:2	74.9	74.9	100%
	1:4	37.5	37.4	99,7%
	1:8	18.7	19.3	103,2%
	1:16	9.4	9.9	105,3%

	1:32	4.7	5.0	106,4%
	1:64	2.4	2.6	108,3%
	1:128	1.2	1.3	108,3%
Среднее = 105,3 %				
2.	Неразведенные	-----	-----	-----
	1:2	68.4	68.4	100,0%
	1:4	34.2	34.2	100,0%
	1:8	17.1	17.6	102,9%
	1:16	8.6	8.5	98,8%
	1:32	4.3	4.4	102,3%
	1:64	2.2	2.4	109,1%
	1:128	1.1	1.2	109,1%
Среднее = 103,2 %				
3.	Неразведенные	-----	-----	-----
	1:2	-----	-----	-----
	1:4	62.5	64.0	102,4%
	1:8	31.3	31.3	100,0%
	1:16	15.6	14.5	92,9%
	1:32	7.8	7.2	92,3%
	1:64	3.9	3.7	94,9%
	1:128	1.9	2.0	105,3%
Среднее = 98,0 %				
4.	Неразведенные	-----	-----	-----
	1:2	-----	-----	-----
	1:4	86.4	88.0	101,9%
	1:8	43.2	43.1	99,8%
	1:16	21.6	21.7	100,5%
	1:32	10.8	10.2	94,4%
	1:64	5.4	5.4	100,0%
	1:128	2.7	2.8	103,7%
Среднее = 100,1 %				

XVIII. СТАНДАРТИЗАЦИЯ

Комплекс Тропонин I-T-C человека был получен от сертифицированного производителя, концентрация cTnI была установлена. В дальнейшем препарат был разведен буфером для разведения образцов cTnI и обозначен как «Сток-раствор стандарта», для приготовления референсных панелей стандартов cTnI. Полученное после разведения значение концентрации cTnI «Сток-раствора стандарта» было подтверждено в анализе Abbott AxSym® TnI.