

НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ В СЫВОРОТКЕ ЧЕЛОВЕКА СЕРДЕЧНОГО ТРОПОНИНА I

1105-18, Troponin I

Каталог. № : 1105-18
Количество : 96
Производитель: DAI (США)

Методика от 07-10-2015



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

Только для использования в диагностике *in vitro*

Анализ	Troponin I
Метод	Иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Конъюгированный пероксидазой конкурентный ИФА
Диапазон обнаружения	0-75 нг/мл
Образец	100 мкл сыворотки
Общее время	~ 110 мин.
Срок годности	12-14 месяцев от даты производства
Специфичность	96 %
Чувствительность	1 нг/мл

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения человеческого сердечного Тропонина I в сыворотке человека. Измерение сТnI используется для оценки острого инфаркта миокарда (АМИ).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА

Тропонин - это подавляющий или сжимающийся регулирующий комплекс протеина поперечно-полосатой мышцы. Он расположен циклически по тонкому волокну мышцы и состоит из трех distinctных протеинов: Тропонин I, тропонин С, и Т. Аналогично, тропонин I субъединица существует в трех отдельных изоформах; два в быстрых и медленных волокнах скелетной мышцы и один в кардио мышце. Кардио изоформа (сТnI) – составляет приблизительно 40%, имеет молекулярную массу 22500 дальтон и имеет 31 дополнительные остатки аминокислоты, которые не присутствуют в скелетной изоформе. Антитела, против этой кардио изоформы иммунологически отличаются от антител, против двух других скелетных изоформ. Уникальная изоформа и специфическая к ткани кардио тропонина I является основной для диагноза острого инфаркта миокарда (АМИ).

Сердечный тропонин I (сТnI) используется при различных диагнозах больных в неотложной помощи с болью в области груди. Инфаркт миокарда диагностируется, когда в крови уровень чувствительных и специфических биомаркеров, таких как кардио тропонин, СК-МВ и миоглобин, увеличивается при клинической установке острой ишемии.

Недавно описанный и наиболее предпочитаемый биомаркер для повреждения миокарда – это кардио тропонин (I или Т). Кардио тропонин показывает специфичность миокардио ткани и высокую чувствительность. Аналогично, кардио ТnI и СК-МВ имеют подобные модели освобождения (4-6 часов после начала боли), но нормы сТnI остаются повышенными более длительный период (6-10 дней), таким образом, обеспечивая более длительный период для определения кардио повреждения.

Уровни сТnI в норме в крови очень низкие. После начала АМИ, уровень сТnI увеличивается основательно и измеряется в сыворотке в пределах от 4 до 6 часов, с наивысшей концентрацией приблизительно на 12-24 часа после образования инфаркта.

Факт, что сТnI остается, повышенным в сыворотке более длительный период времени, а также его увеличенная диагностическая чувствительность и кардио специфичность, дает возможность раннего определения АМИ после начала ишемии (4 часа), а также диагноз инфаркта в случаях, где ожидается высокая норма белков скелетной мышцы.

К тому же, недавние данные идентифицировали измеримые соотношения между уровнем кардио тропонина и долговременным результатом после дискомфорта в области груди. Изучения показали, что использование сТnI демонстрирует высоко прогнозируемое значение при очертании группы высокого риска в больных непостоянной ангиной и что эти тестирования могут использоваться в оценке пациентов ED.

Данный набор обеспечивает быстрый, чувствительный, и надежный анализ для количественного измерения кардио специфического тропонина I. Антитела, развитые для теста определяют минимальную концентрацию 1,0 нг/мл, и нет взаимной реактивности с человеческим кардио тропонином Т или скелетным тропонином Т или I.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

сТnI ELISA - твердофазовый ферментно-связанный иммуносорбентный анализ. В анализе используются одно моноклональное антитело, направленное против distinctной антигенной детерминанты на молекуле. Три мышиных моноклональных анти-сТnI антитела используются для иммобилизации на солидной фазе (на микропланшетных лунках). Четвертое антитело находится в растворе антитело-энзим (пероксидаза хрена) конъюгате. Образец теста одновременно реагирует с четырьмя антителами, в результате молекулы ТnI оказываются в сендвиче между солидной фазой и энзимно-связанными антителами. После 90 минутной инкубации при комнатной температуре, лунки промываются для удаления несвязанных меченых антител. Добавляется ТМБ реагент и инкубируется 20 минут, в результате развивается голубой цвет. Развитие цвета останавливается добавлением стоп раствора, что изменяет цвет на желтый. Концентрация ТnI прямо пропорциональна интенсивности цвета в образце. Абсорбция измеряется спектрофотометрически при 450 нм.

СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. В этом тесте используются образцы СЫВОРОТКИ.
2. Образцы необходимо собрать, используя стандартную технику венопункции. Удалите сыворотку от коагулированных клеток в течении 60 минут после забора.
3. Образцы, которые не могут быть проанализированы в течении 24 часов после забора, необходимо заморозить до -20°C или ниже. Они остаются стабильны 6 месяцев.
4. Избегайте сильно гемолизированных (ярко красные), липемических (молочных) или мутных образцов (после центрифугирования).
5. Избегайте повторных циклов замораживания / оттаивания образцов. Не храните в холодильнике с системой само размораживания. Образцы, которые после замораживания являются мутными или содержат частицы, должны быть центрифугированы.

РЕАГЕНТЫ И ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Планшет с привитыми мышиными моноклональными анти-ТnI, 1 на 96 лунк.
2. Набор референтных стандартов: 1 набор, 1.0 мл/фл, содержащий 0, 2.0, 7.5, 30 и 75 нг/мл ТnI, лиофилизированные.
3. сТnI ферментный конъюгат, 13 мл/фл, содержащий мышиное анти-ТnI конъюгированное с пероксидазой хрена в растворе Tris буфера-BSA с консервантами
4. Реагент ТМБ, 11 мл/бут., содержащий раствор ТМБ.
5. Стоп раствор, 11 мл/бут., содержащий разбавленную 1N HCl.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Дистиллированная или деионизированная вода.
2. Точные пипетки: 5, 10, 50, 100 мкл и 1,0 мл.
3. Одноразовые наконечники к пипеткам.
4. Микропланшетный считыватель с возможностью считывания абсорбции при 450 нм.
5. Вихревой смеситель или аналог.
6. Абсорбирующая бумага.
7. Графическая бумага.
8. Контроль Cardiac marker Tri-level, кат. № 685 (Bio-rad Laboratories Diagnostics Group, Hercules, CA94547).

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. Все реагенты следует привести к комнатной температуре (18-25 $^{\circ}\text{C}$) перед использованием.
2. Разведите лиофилизированные стандарты 1,0 мл дистиллированной водой. Выдержите разбавленный материал 20 минут и смешайте. Разбавленные стандарты стабильны 8 часов при 2-8 $^{\circ}\text{C}$. Уничтожьте разбавленные стандарты после 8 часов. Для полной уверенности в стабильности разбавленных стандартов немедленно после разбавления стандартов, заморозьте аликвоты до

-20 °C и храните замороженными. Не повторяйте циклы замораживания/размораживания.

- Сыворотка пациента с ожидаемой концентрацией выше, чем 100 нг/мл должна быть разбавлена разбавителем (по запросу).

ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- Рекомендуемое пипетирование (одно- или многоканальное): Пипетирование образцов, стандартов и контролей должно проводиться в течении 3 минут.
- Все стандарты, образцы и контроли должны тестироваться в дубликаты, что бы все условия тестирования были идентичные.
- Рекомендуется, чтобы все лунки были считаны в течении 15 минут после добавления стоп раствора.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Поместите необходимое количество лунок в держатель.
- Внесите 100 мкл стандартов, образцов и контролей в соответствующие лунки.
- Внесите 100 мкл реагента энзимного конъюгата в каждую лунку.
- Тщательно перемешайте 30 секунд. Очень важно добиться полного смешивания.
- Инкубируйте при комнатной температуре (18-25 °C) 90 минут.
- Удалите инкубационный раствор в контейнер для отходов.
- Промойте лунки 5 раз деионизированной или дистиллированной водой. Не используйте вод из-под крана.
- Резко переверните лунки на абсорбирующую бумагу. Для удаления остатков воды.
- Внесите 100 мкл ТМБ раствора в каждую лунку. Легко перемешайте 5 секунд.
- Инкубируйте 20 минут при комнатной температуре.
- Остановите реакцию добавлением 100 мкл стоп раствора в каждую лунку.
- Легко перемешайте 30 секунд. **Важно добиться, чтобы синий цвет полностью изменился на желтый.**
- Считайте абсорбцию при 450 нм микропланшетным считывателем при 450 нм **в течении 15 минут.**

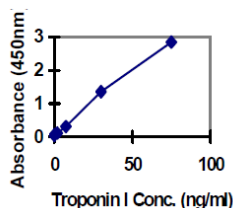
ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Вычислите значение средней абсорбции (ОП₄₅₀) для каждого набора стандартов, контролей и образцов.
- Постройте стандартную кривую, откладывая среднюю абсорбцию, полученную для каждого стандарта против его концентрации в мг/л на графической бумаге, с абсорбцией на оси у и концентрацией на оси х.
- Используя среднюю абсорбцию для каждого образца, определите соответствующую концентрацию сТnI (нг/мл) со стандартной кривой. Зависимо от опыта и/или компьютерных возможностей, могут использоваться другие методы обработки данных.
- Образцы пациентов с концентрацией сТnI выше, чем 100 нг/мл, должны быть разбавлены 10 крато разбавителем образца (по запросу). Конечные значения сТnI должны быть умножены на 10 для получения результатов сТnI в нг/мл.

ПРИМЕР КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Результаты типичной процедуры калибровки с абсорбцией, считанной при 450 нм, показанной на оси у против концентрации сТnI на оси х. Эта калибровочная кривая только для иллюстрации и не должна использоваться для вычисления результатов. Каждая лаборатория должна устанавливать собственные данные и калибровочную кривую в каждом эксперименте.

сТnI (нг/мл)	Абсорбция (450 нм)
0	0,048
2,0	0,110
7,5	0,307
30	1,357
75	2,853



ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- Надежные и соответствующие результаты будут получены при проведении анализа в соответствии с инструкцией и хорошей лабораторной практикой.
- Результаты могут использоваться как дополнение к другим диагностическим процедурам.

- Образцы сыворотки сильно липемические, гемолизированные или мутные не должны использоваться в этом тесте.
- Процедура промывания – критична. Недостаточное промывание может привести к неточным результатам.
- Образцы пациентов могут содержать человеческие анти-мышинные антитела (НАМА), что могут влиять на результаты. Данный набор разработан для минимизирования влияния НАМА-содержащих образцов. Но, полного исключения этого влияния мы не можем гарантировать.
- Результаты, что не соответствуют клинической картине или истории пациента должны интерпретироваться с осторожностью.

КЛИНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Было проведено клиническое изучение для определения точности, чувствительности и специфичности сТnI ELISA при сравнении с другим коммерческим набором. Данные представлены ниже.

1. Клиническое соотношение:

Статистическое изучение 204 образцов сыворотки человека, при концентрации сТnI от 0,7 нг/мл до 595 нг/мл, демонстрирует соотношение с коммерческим набором (0,5 нг/мл до 484 нг/мл; Abbot AxSym®), что показано ниже:

Сравнение данного набора с Abbot AxSym тестом дало следующие данные:

Коэффициент корреляции = 0,9537
Отклонение = 0,9063
Пересечение: = -3,9875
Среднее = 45,57 нг/мл
Среднее Abbote = 50,37 нг/мл

Когда образцы, которые превышали лимит Abbot анализа, были отделены (напр. >50 нг/мл) были получены следующие данные. Это было сделано для демонстрации соответствия между анализами при использовании не разбавленных образцов.

Коэффициент корреляции = 0,8672
Отклонение = 1,0416
Пересечение: = 0,7816
Среднее = 9,96 нг/мл
Среднее Abbote = 12,72 нг/мл

2. Клиническая чувствительность и специфичность

Общее число 149 пациентов (249 образцов) были изучено, было 93 пациентов с подтвержденным AMI. Была оценена специфичность и чувствительность сТnI, основываясь на клинической величине исключения равной 1,5 нг/мл. Клиническая специфичность составила 87,5% (95%CI: 80,3% - 94.7%), тогда как чувствительность равна 100%.

Результаты этих исследований показывают, что данный набор соответствует коммерческому набору.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. Чувствительность

Минимально определяемая концентрация сТnI при измерении при 2 СО от среднего значения нулевого стандарта равна 1,0 нг/мл. Дополнительно, была определена функциональная чувствительность, что равна 0,75 нг/мл (как определено при внутри тестовом %KB ≤ 10%). **Нижняя граница равна 0,48 нг/мл, верхняя граница = 1,0 нг/мл сТnI.**

2. Побочный эффект

Не обнаружено побочных эффектов при тестировании образцов с концентрацией сТnI до 10000 нг/мл.

3. Точность

А. Точность в анализе была определена тестированием семи разных сывороток в одном анализе.

Образец сыворотки	1	2	3	4	5
К-во репликатов	20	20	20	20	20
Средн. сТnI (нг/мл)	1,69	5,93	24,3	44,9	89,8
СО	0,05	0,22	1,35	1,78	2,52
KB (%)	2,8	3,7	5,6	4,0	2,8

В. Точность между анализами была определена измерением шести разных образцов сыворотки при индивидуальных калиброванных тестах.

Образец сыворотки	1	2	3	4	5
К-во репликатов	20	26	26	26	26
Среднее сТnI (нг/мл)	1,68	5,88	24,56	48,91	85,81
СО	0,11	0,28	1,14	2,23	3,76
KB (%)	6,7	4,8	4,7	4,6	4,4

4. Специфичность

Следующие аналиты были тестированы на перекрестную реактивность:

Тестируемые материалы	Концентрация
Тропонин С скелетного мускула кролика	2,500 нг/мл
Сердечный тропонин Т человека	2,500 нг/мл
Тропонин Т скелетного мускула человека	2,500 нг/мл
Тропонин I скелетного мускула человека	2,500 нг/мл
Гемоглобин	1.2 г/дл
Билирубин	20 мг/дл
Холестерин	500 мг/дл
Триглицерид	1,000 мг/дл
Общий протеин	10 г/дл

5. Изучение линейности и восстановления

А. Восстановление

Разные образцы сыворотки с известным уровнем сТпI были скомбинированы и проанализированы в дубликате. Среднее значение восстановления равно 93,3%

Номер пар	Ожидаемые сТпI (нг/мл)	Полученные сТпI (нг/мл)	% Восстановления
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

Образцы четырех пациентов были последовательно разбавлены для определения линейности. Среднее восстановление составило 101.7%.

(Данные линейности см. в таблице в оригинале инструкции).

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Необходимо, чтобы контрольные образцы использовались при каждой калибровочной кривой, для оценки характеристик теста. Контрольные материалы должны тестироваться повторно, чтобы установить средние значения и границы.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Обращайтесь с реагентами и образцами как с потенциально инфицированными.
2. Избегайте контакта с стоп раствором. Это может вызывать ожог. При попадании на кожу, промойте водой и обратитесь за медицинской помощью.
3. Не используйте реагенты после окончания срока пригодности и не смешивайте компоненты с разных лотов.
4. Немедленно закрывайте крышки реагентов.
5. Не пипетируйте реагенты ртом.
6. Для диагностики *in vitro*.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

1. Храните невскрытые наборы при 2-8 °С до окончания срока пригодности, указанного на ярлыке.
2. Храните планшет в запечатанном пакете с осушителем для минимизации попадания воздуха.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com