



**Набор ИФА  
для количественного определения в  
сыворотке человека сердечного  
ТРОПОНИНА I**

**Кат. №** : 1105Z  
**Количество** : 96  
**Производитель** : DAI (США)

*Методика от 05-26-2011*

**Внимание:** основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

Только для использования в диагностике *in vitro*

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

**НАЗНАЧЕНИЕ**

Настоящий набор предназначен для количественного определения человеческого сердечного тропонина I в сыворотке человека. Измерение сТпI используется для оценки острого инфаркта миокарда (АМІ).

**КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА**

Тропонин - это подавляющий или сжимающий регулирующий комплекс протеина поперечно-полосатой мышцы. Он расположен циклически по тонкому волокну мышцы и состоит из трех дистинктных 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 (сТпI) – 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 (АМІ).

Сердечный тропонин I (сТпI) 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 ТпI и СК-МВ имеют подобные модели освобождения (4-6 часов после начала боли), но нормы сТпI остаются повышенными более длительный период (6-10 дней), таким образом, обеспечивая более длительный период для определения кардио повреждения.

Уровни сТпI в норме в крови очень низкие. После начала АМІ, уровень сТпI 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 сТпI остается, повышенным в сыворотке более длительный период времени, а также его увеличенная диагностическая чувствительность и кардио специфичность, дает возможность раннего определения АМІ 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 сТпI 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**

сТпI ELISA есть твердо-фазовый ферментно-связанный иммуносорбентный анализ. В анализе используются одно моноклональное антитело, направленное против дистинктной антигенной детерминанты на молекуле. Три мышинных моноклональных анти- сТпI 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 ТпI оказываются в сендвиче между солидной фазой и ферментно-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 ТпI прямо пропорциональна интенсивности цвета в образце. Абсорбция измеряется спектрофотометрически при 450 нм.

**РЕАГЕНТЫ И ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ**

1. **Планшет** с привитыми мышинными моноклональными анти-ТпI, 1 на 96 лунок.
2. **Набор референтных стандартов: 1 набор, 1,0 мл/фл,** содержащий 0, 2.0, 7.5, 30 и 75 нг/мл ТпI, лиофилизированные.
3. **сТпI ферментный конъюгат, 13 мл/фл,** содержащий мышинное анти-ТпI конъюгированное с пероксидазой хрена в растворе Tris буфера-BSA с консервантами
4. **Реагент ТМБ, 11 мл/бут.,** содержащий раствор ТМБ.
5. **Стоп раствор, 1 бут., 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)

**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<sup>0</sup>С до окончания срока пригодности, указанного на ярлыке.
2. Храните планшет в запечатанном пакете с осушителем для минимизации попадания воздуха.

**ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ**

1. Все реагенты следует привести к комнатной температуре (18-25<sup>0</sup>С) 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<sup>0</sup>С.** Уничтожьте разбавленные стандарты после 8 часов. **Для полной уверенности в**

**стабильности разбавленных стандартов немедленно после разбавления стандартов, заморозьте аликваты до  $-20^{\circ}\text{C}$  и храните замороженными. Не повторяйте циклы замораживания / размораживания.**

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

#### ИНСТРУМЕНТАРИЙ

Для измерения абсорбции необходим микропланшетный считыватель с шириной размаха 10 нм или меньше и оптической плотностью в границах 0-3 ОП или выше при длине волны 450 нм.

#### СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

- В этом тесте используются образцы сыворотки.
- Образцы необходимо собрать, используя стандартную технику венепункции. Удалите сыворотку от коагулированных клеток в течении 60 минут после забора.
- Образцы, которые не могут быть проанализированы в течении 24 часов после забора, необходимо заморозить до  $-20^{\circ}\text{C}$  или ниже. Они остаются стабильны 6 месяцев.
- Избегайте сильно гемолизированных (ярко красные), липемических (молочных) или мутных образцов (после центрифугирования).
- 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.

#### 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 б все условия тестирования были идентичные.
- Рекомендуется, чтобы все лунки были считаны в течении 15 минут после добавления стоп раствора.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Поместите необходимое количество ячеек в держатель.
- Внесите 100 мкл стандартов, образцов и контролей в соответствующие лунки.
- Внесите 100 мкл реагента ферментного конъюгата в каждую лунку.
- Тщательно перемешайте 30 секунд. Очень важно добиться полного смешивания.
- Инкубируйте при комнатной температуре ( $18-25^{\circ}\text{C}$ ) 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.**

#### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

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

#### ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Вычислите значение средней абсорбции ( $\text{OP}_{450}$ ) 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 сТпI (нг/мл) со стандартной кривой. Зависимо от опыта и/или компьютерных возможностей, могут использоваться другие методы обработки данных.
- Образцы пациентов с концентрацией сТпI выше, чем 100 нг/мл, должны быть разбавлены 10 кратно разбавителем образца (по запросу). Конечные значения сТпI должны быть умножены на 10 для получения результатов сТпI в нг/мл.

#### ПРИМЕР КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Результаты типичной процедуры калибровки с абсорбцией, считанной при 450 нм, показанной на оси у против концентрации сТпI 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.

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

(Пример типичной калибровочной кривой см.в оригинале инструкции).

#### 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.

#### ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Оценка клинических данных была проведена для определения нормальных значений, а также клинической чувствительности и специфичности. 225 здоровых взрослых были тестированы для определения нормальных значений, что равны  $\leq 0,5$  нг/мл сТпI. Все значения, полученные для нормальной популяции, были ниже уровня чувствительности анализа (1,0 нг/мл).

Рекомендуется, что б каждая лаборатория устанавливала собственные нормальные границы, основываясь на популяции пациентов. Исходя из данных, указанных в литературе, величина исключения для АМI равна 1,5 нг/мл.

На увеличение уровня сТпI могут влиять другие условия, такие как: нестабильная стенокардия, застойная сердечная недостаточность, операция на сердце или инвазивное исследование.

**Примечание:** Может быть необходима серия образцов для определения повышенного уровня.

#### КЛИНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

##### 1. Клиническое соотношение:

Статистическое изучение 204 образцов сыворотки человека, при концентрации сТпI 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 АМИ. Была оценена специфичность и чувствительность сТпI, 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 сТпI 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 %КВ ≤ 10%). **Нижняя граница равна 0,48 нг/мл, верхняя граница = 1,0 нг/мл сТпI.**

### 2. Побочный эффект

Не обнаружено побочных эффектов при тестировании образцов с концентрацией сТпI 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. сТпI (нг/мл)	1,69	5,93	24,3	44,9	89,8
СО	0,05	0,22	1,35	1,78	2,52
КВ (%)	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 сТпI (нг/мл)	1,68	5,88	24,56	48,91	85,81
СО	0,11	0,28	1,14	2,23	3,76
КВ (%)	6,7	4,8	4,7	4,6	4,4

### 4. Специфичность

Следующие анализы были протестированы 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).

## СТАНДАРТИЗАЦИЯ

Человеческий Тропонин I-T-C был получен из качественного материала и была определена концентрация сТпI. Материал был дальше разбавлен сТпI разбавителем образца и обработан как указано в «Стандартный исходный раствор» для приготовления установленного набора стандартов. Конечная величина «Стандарта исходного раствора» была подтверждена анализом Abbott AxSym Troponin.

## ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

## ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
Тел.: (0342) 775 122  
Факс: (0342) 75612  
E-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)