



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

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

Методика от 07-05-2008

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

Только для использования в диагностике *in vitro*

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения человеческого кардио тропонина I в сыворотке человека. Измерение сТnI используется для оценки острого инфаркта миокарда (AMI).

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 дистинктивных 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 (AMI).

Сердечный тропонин I (сТnI) используется при различных диагнозах больших 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 AMI, 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 AMI 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 одновременно 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 есть твердо-фазовый ферментно-связанный иммуносорбентный анализ. В анализе используются одно

моноклональное антитело, направленное против дистинктивной антигенной детерминанты на молекуле. Три мышиных моноклональных анти-сТnI антитела используется 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 ферментно-связанными антителами. После 90 минутной инкубации при комнатной температуре, лунки промываются для удаления несвязанных меченых антител. Добавляется ТМВ 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.

РЕАГЕНТЫ И ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. **Планшет** с привитыми мышиными моноклональными анти-ТnI, 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 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 ТМВ, 11 мл/бут.**, содержащий раствор ТМВ.
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 вызвать 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°C 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°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°C.** Уничтожьте разбавленные стандарты после 8 часов. **Для полной уверенности в стабильности разбавленных стандартов немедленно после разбавления стандартов, заморозьте аликваты до -20°C и храните замороженными. Не повторяйте циклы замораживания / размораживания.**
3. 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

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.

ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

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

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Поместите необходимое количество ячеек в держатель.
2. Внесите 100 мкл стандартов, образцов и контролей в соответствующие лунки.
3. Внесите 100 мкл реагента ферментного конъюгата в каждую лунку.
4. Тщательно перемешайте 30 секунд. Очень важно добиться полного смешивания.
5. Инкубируйте при комнатной температуре ($18-25^{\circ}\text{C}$) 90 минут.
6. Удалите инкубационный раствор в контейнер для отходов.
7. Промойте лунки 5 раз деионизированной или дистиллированной водой. Не используйте вод из-под крана.
8. Резко переверните лунки на абсорбирующую бумагу. Для удаления остатков воды.
9. Внесите 100 мкл ТМВ раствора в каждую лунку. Легко перемешайте 5 секунд.
10. Инкубируйте 20 минут при комнатной температуре.
11. Остановите реакцию добавлением 100 мкл стоп раствора в каждую лунку.
12. Легко перемешайте 30 секунд. **Важно добиться, что бы синий цвет полностью изменился на желтый.**
13. 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

1. Вычислите значение средней абсорбции (OP_{450}) для каждого набора стандартов, контролей и образцов.
2. 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.
3. 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.
4. Образцы пациентов с концентрацией сТnI выше, чем 100 нг/мл, должны быть разбавлены 10 кратно 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

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

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. Надежные и соответствующие результаты будут получены при проведении анализа в соответствии с инструкцией и хорошей лабораторной практикой.
2. Результаты могут использоваться как дополнение к другим диагностическим процедурам.
3. Образцы сыворотки сильно липемические, гемолизированные или мутные не должны использоваться в этом тесте.
4. Процедура промывания – критична. Недостаточное промывание может привести к неточным результатам.
5. 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.
6. 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 сТnI. 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 АМl равна 1,5 нг/мл.

На увеличение уровня сТnI могут влиять другие условия, такие как: ангина, сердечная недостаточность, кардиохирургическое вмешательство или инвазивное тестирование.

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

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 АМl. 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 $\leq 10\%$). **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
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 сТnI (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 аналиты были протестированы на перекрестную реактивность:

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

5. Изучение линейности и восстановления**А. Восстановление**

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

Номер пар	Ожидаемые сТnI (нг/мл)	Полученные сТnI (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 сТnI. Материал был дальше разбавлен сТnI 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.com