



**Набор ИФА**  
**для количественного определения в сыворотке**  
**человека концентрации**  
**МИОГЛОБИНА**

**Каталог. №** : EIA-3955  
**Количество** : 96  
**Производитель**: DRG (США)

*Методика от 17-06-2010*

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

**ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO**

ХРАНИТЬ ПРИ 2-8°C

**ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ**

Для количественного определения концентрации миоглобина в сыворотке или человека.

**ВВЕДЕНИЕ**

Миоглобин это гемсодержащий белок, обнаруживаемый и в сердечной и скелетной мышце. После некроза миокарда ассоциированного с инфарктом из всех маркеров одним из первых повышается уровень миоглобина, заметно превышая норму в течение 2-4 часов после инфаркта, достигая пика через 9-12 часов, и возвращаясь к норме через 24-36 часов после инфаркта. При отсутствии травмы скелетной мышцы и других факторов ассоциированных с некардиальным подъемом циркулирующего миоглобина, уровень миоглобина используется как ранний маркер инфаркта миокарда.

**ПРИНЦИП АНАЛИЗА**

Набор ИФА Myoglobin ELISA основывается на принципе твердофазного иммуноферментного анализа. Используются уникальные моноклональные антитела к антигенной детерминанте на молекуле миоглобина. Мышинные моноклональные антитела к миоглобину иммобилизованы на микротитровальных лунках. Козьи антитела к миоглобину представлены в виде раствора конъюгата. Пробы пациента одновременно реагируют с двумя антителами, что приводит к образованию «сэндвич» комплексов, где молекула миоглобина «фиксируется» между антителами твердой фазы и антителами с ферментной меткой. После 45-минутной инкубации при комнатной температуре лунки промываются водой для удаления несвязанных меченых антител. ТМБ реагент добавляется и инкубируется 20 минут, в результате чего появляется голубое окрашивание. Проявление цвета прекращается добавлением стоп-раствора, что меняет окрашивание на желтое. концентрация миоглобина прямо пропорциональна интенсивности окрашивания тестового образца. Абсорбция измеряется фотометрически при длине волны 450 нм.

**РЕАГЕНТЫ**

**Материалы, входящие в состав набора:**

1. **Лунки, покрытые антителами** (1 планшет/96 лунок) покрытые мышиными моноклональными антителами к миоглобину,
2. **Комплект референтных стандартов** (0,5 мл/флакон, 1 комплект). Содержит 0, 25, 100, 250, 500 и 1000 нг/мл миоглобина. Жидкие, готовы к использованию. **Эти стандарты предварительно разведены 10-кратно. Не разводить повторно!**
3. **Раствор для разведения образцов** (25 мл/бутылка). Содержит фосфатный буфер и 1,0% (в/о) Проклина в качестве консерванта.
4. **Реагент ферментного конъюгата** (22 мл/флакон). Содержит анти-миоглобин, конъюгированный с пероксидазой хрена в растворе трис буфера-БСА с консервантами.
5. **ТМБ-реагент** (11 мл/бутылка). Содержит готовый ТМБ-раствор.

6. **Стоп-раствор** (11 мл/бутылка). Содержит разведенную соляную кислоту (1N HCl).

**Материалы, не входящие в состав набора:**

- Прецизионные пипетки: 20 мкл, 50 мкл, 200 мкл и 1,0 мл
- Одноразовые наконечники для пипеток
- Дистиллированная вода
- □□ вортекс-миксер или аналог
- Впитывающая бумага или бумажные полотенца
- □□ Графопостроительная бумага
- Микротитрационный планшетный ридер

**МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ**

1. **ВНИМАНИЕ:** настоящий набор содержит материал человеческого происхождения. Не существует методов анализа, гарантирующих полное отсутствие в наборе вирусов гепатита В, ВИЧ (ВИЧ 1/2 и вируса гепатита С), или других инфекций. Поэтому со всеми продуктами человеческого происхождения, в том числе с образцами пациентов необходимо обращаться как с потенциально опасными.
2. Не использовать реагенты после истечения срока годности, и не смешивать или использовать компоненты других наборов с различными серийными номерами.

**УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ**

1. Неоткрытый набор хранить при температуре 2-8°C со дня поступления. Открытый набор стабилен до даты срока годности, указанной на упаковке при хранении в вышеупомянутых условиях. Срок годности указан на этикетке упаковки.
2. Вскрытые и использованные реагенты стабильны до истечения срока годности при соблюдении условий хранения при 2-8°C.
3. Микротитрационный планшет хранить в герметично закрытом пакете с влагопоглотителем, чтобы минимизировать влияние влажного воздуха.

**ИНСТРУМЕНТ ПРИЙ**

Микропланшетный ридер с шириной дорожки 10 нм или менее и диапазоном ОП 0-3 или более на длине волны 450 нм может использоваться для измерения абсорбции.

**ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ**

Все реагенты необходимо довести до комнатной температуры (18-25°C).

**Сыворотки пациента и контрольные сыворотки необходимо развести 10-кратно перед использованием. Приготовить несколько небольших пробирок (микропробирки 1,5 мл для центрифуги) и смешать 20 мл сыворотки с 180 мкл (0.18 мл) раствора для разведения образцов.**

**НЕ РАЗВОДИТЬ СТАНДАРТЫ - ОНИ ПРЕДВАРИТЕЛЬНО РАЗВЕДЕНЫ 10-КРАТНО.**

Образцы с предполагаемой концентрацией миоглобина более 1000 нг/мл можно развести раствором для разведения образцов в 10 раз.

**СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ**

Для этого исследования необходимо использовать образцы сыворотки.

Образцы можно собрать методом стандартной венепункции. Удалить сыворотку из коагулированных или свернувшихся в течение 1 часа после забора.

Образцы которые невозможно исследовать в течение 24 часов после забора необходимо заморозить до -20°C или ниже, которые будут оставаться стабильными до 6 мес.

Перед использованием образцы нельзя многократно замораживать или размораживать. НЕ ХРАНИТЬ в неразмораживающихся морозильниках, т.к. это может привести к случайному размораживанию.

Замороженные образцы и образцы с твердым осадком (или мутные) необходимо отцентрифугировать перед использованием.

**ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ**

- Рекомендации по пипетированию (одно- и многоканальная пипетка): пипетирование всех стандартов, образцов и контролей следует завершить в течении 3 минут.
- Все стандарты, образцы и контроли следует параллельно анализировать в двойном экземпляре, соблюдая единство всех условий исследования.

- Рекомендуется считать все лунки в течение 15 минут после добавления стоп-раствора.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. **Перед использованием сыворотки пациента и контрольные сыворотки необходимо развести в 10 раз. Приготовить несколько маленьких пробирок и смешать 20 мл сыворотки или плазмы с 180 мкл (0.18мл) раствора для разведения образцов. НЕ РАЗВОДИТЬ СТАНДАРТЫ – ОНИ ПРЕДВАРИТЕЛЬНО РАЗВЕДЕНЫ (1:10)!**
2. Установить необходимое количество лунок в рамку.
3. Раскапать по 20 мкл стандартов, разведенных образцов и разведенных контролей в соответствующие лунки.
4. Раскапать по 200 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку.
5. Тщательно смешивать в течение 30 секунд. Очень важно смешать полностью!
6. Инкубировать при комнатной температуре (18-25°C) 45 минут.
7. Удалить инкубированную смесь, вытряхнув содержимое лунок в мусорный контейнер.
8. Промыть лунки дистиллированной водой и вытряхнуть остатки влаги 5 раз. (Не использовать водопроводную воду!)
9. Резко вытряхнуть содержимое лунок на абсорбирующую бумагу или бумажное полотенце – удалить остатки влаги.
10. Раскапать по 100 мкл ТМБ – реагента в каждую лунку. Осторожно смешивать в течение 5 секунд.
11. Инкубировать 20 минут при комнатной температуре.
12. Остановить реакцию добавив по 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку.
13. Аккуратно смешивать 30 секунд. **Важно убедиться в том что смена голубого окрашивания на желтое произошла полностью.**
14. Считать абсорбцию при 450 нм на микропланшетном ридере в течение **15 минут**.

#### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Квалифицированная лабораторная практика требует, чтобы образцы (контроли) контроля качества использовались в каждой калибровочной кривой для проверки эффективности анализа.

Для обеспечения надлежащей работы контрольный материал следует анализировать повторно для установления средних значений и приемлемых диапазонов.

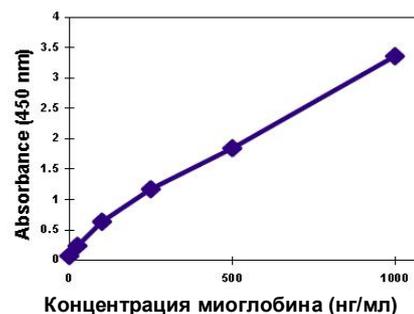
#### ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Подсчитать среднее значение абсорбции (A450) для каждого набора референс стандартов, контролей и образцов.
2. Начертить на миллиметровой бумаге стандартную кривую, откладывая средние значения абсорбции референс стандартов (на оси Y) напротив их концентраций в нг/мл на оси X.
3. Использовать средние значения абсорбции образцов для определения соответствующей концентрации миоглобина в нг/мл по стандартной кривой.
4. Т.к. референсные стандарты были предварительно разведены в 10 раз, нет необходимости умножать полученные значения образцов пациентов и контрольных сывороток на коэффициент разведения (10). Однако, если образцы пациентов развоились в 100 раз, полученные значения необходимо умножить на 10.

#### ПРИМЕР КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Результат типичной процедуры постановки стандарта с оптическими плотностями измеренными на 450 нм откладываются на оси Y, концентрации миоглобина – на оси X. Эта калибровочная кривая приведена только в качестве иллюстрации, не использовать для подсчета неизвестных! Каждая лаборатория должна получать собственные данные и калибровочную кривую.

Миоглобин (нг/мл)	Абсорбция (450 нм)
0	0,046
25	0,158
100	0,476
250	1,070
500	1,741
1000	2,664



#### ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Надежные и воспроизводимые результаты достигаются при условии четкого следования данной инструкции и хорошей лабораторной практики.

Процедура промывки очень важна. Некачественная промывка приведет к низкой точности результатов и завышенным значениям абсорбции.

Результаты, полученные в ходе использования данного набора можно использовать только в качестве дополнения к другим диагностическим процедурам и информации лечащего врача.

Образцы пациентов могут содержать антитела НАМА, которые могут давать заниженные или завышенные результаты в методиках, предусматривающих использование мышиных антител. Данный набор был разработан таким образом, чтобы минимизировать влияние образцов содержащих НАМА. Однако полностью избежать такого влияния не представляется возможным. Результат анализа, не совпадающий с клинической картиной и историей болезни следует интерпретировать с особой осторожностью.

#### ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ НОРМЫ

Нормальный уровень миоглобина в сыворотке равен от 12 до 100 нг/мл. С возрастом наблюдается незначительное повышение.

Диапазон нормы гемоглобина после проведения определенных исследований был от 8,1 до 54,5 нг/мл миоглобина.

Каждая лаборатория должна установить собственные референтные интервалы для миоглобина, определяемого ИФА методом. Другие факторы так же должны учитываться в диагностике инфаркта миокарда.

**Примечание:** последовательный сбор образцов может потребоваться для определения повышенных уровней.

#### РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

##### Клиническая эффективность

Клиническое исследование проводилось, чтобы определить точность настоящего ИФА миоглобина по сравнению с набором Abbott AxSym Myoglobin MEIA. Данные представлены ниже.

Статистическое изучение, использующее 150 клинических серологических образцов пациентов, в диапазоне концентрации миоглобина от 3,7 нг/мл до 919,8 нг/мл как проанализировано с использованием настоящего ИФА миоглобина (13,0 нг/мл до 1011,0 нг/мл в наборе Abbott Myoglobin MEIA), продемонстрировал эквивалентную корреляцию с набором AxSym Myoglobin как показано ниже.

Коэффициент корреляции = 0,9392

Наклон = 0,8871

Пересечение = 55.051

Среднее = 287,9 нг/мл

Среднее Abbott Myoglobin = 262,5 нг/мл

##### Чувствительность

Самый низкий определяемый уровень миоглобина с помощью этого анализа составляет 5 нг/мл.

##### «Хук-эффект»

Хук-эффекта для концентраций образцов пациентов до 10,000 нг/мл не наблюдалось.

##### Точность

###### а. Точность в анализе

Точность в процедуре была определена с помощью репликатов 5 разных образцов сыворотки в одном анализе. Вариабельность в анализе указана ниже:

Образец сыворотки	1	2	3	4	5
К-во репликантов	20	20	20	20	20
Среднее миоглобина (нг/мл)	55,6	214,3	294,9	505,9	1,437
СО	2,2	12,9	16,2	26,3	94,0
КВ (%)	3,9%	6,0%	5,5%	5,2%	6,6%

*b. Точность между анализами*

Точность между анализами была определена измерением репликатов 5 разных образцов сыворотки в серии отдельно откалиброванных анализов. Вариабельность между анализами указана ниже:

Образец сыворотки	1	2	3	4	5
К-во репликантов	35	35	35	35	35
Среднее миоглобина (нг/мл)	59,2	244,4	330,5	568,3	1451,7
СО	4,6	12,8	38,9	52,7	104,7
КВ (%)	7,8%	5,2%	11,8%	9,3%	7,2%

(Данные по восстановлению, линейности и специфичности см. в оригинале инструкции).

**ЛИТЕРАТУРА**

(См. в оригинале инструкции).

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:**

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
 Тел.: (0342) 775122  
 Тел/факс: (0342) 775612  
 E-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)