

НАБІР РЕАГЕНТІВ ТРОПОНІН І ELISA

Тропонін І ELISA

Каталог. №: **EIA-2952**

Дата випуску інструкції: **2019/01**
Версія **7.0**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1 ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір сТnI ELISA призначений для кількісного визначення серцевого тропоніну І у сироватці людини. Вимірювання значень тропоніну І корисне для оцінки гострого інфаркту міокарда (ГІМ).

2 КОРОТКИЙ ОПИС ТА ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ

Тропонін - це інгібуючий або скоротливий регулюючий білковий комплекс поперечно-смугастої мускулатури. Він періодично розташований уздовж тонкої нитки м'яза і складається з трьох різних білків: тропоніну І, тропоніну С і тропоніну Т.

Так само субодиниця тропоніну І існує у трьох окремих ізоформах; дві у волокнах скелетних м'язів, які швидко та повільно скорочуються і одна у серцевому м'язі. Ізоформа серця (сТnI) приблизно на 40% несхожа, має молекулярну масу 22 500 дальтон і має 31 додатковий амінокислотний залишок, якого немає у скелетних ізоформах. Антитіла, вироблені проти цієї серцевої ізоформи, імунологічно відрізняються від антитіл, вироблених проти двох інших скелетних ізоформ, а унікальна ізоформа та тканинна специфічність серцевого тропоніну І є основою для його використання при діагностиці гострого інфаркту міокарда (ГІМ).

Серцевий тропонін І (сТnI) був корисним при диференційній діагностиці пацієнтів, які надходять у відділення невідкладної допомоги (ЕД) з болями в грудях. Інфаркт міокарда діагностується при підвищенні рівня чутливих і специфічних біомаркерів у крові, таких як серцевий тропонін, ізофермент МВ креатинкінази (СК-МВ) та міоглобін, у клінічних умовах гострої ішемії.

Останнім описаним і бажаним біомаркером для пошкодження міокарда є серцевий тропонін (І або Т). Серцеві тропоніни виявляють специфічність тканин міокарда та високу чутливість. Аналогічно, серцеві ТnI та СК-МВ мають подібні схеми вивільнення (через 4-6 годин після початку болю), але рівень сТnI залишається підвищеним протягом тривалого періоду часу (6-10 днів), що забезпечує довше вікно виявлення серцевої травми.

Нормальні рівні сТnI у крові дуже низькі. Після початку ГІМ рівень сТnI значно зростає і його можна виміряти у сироватці протягом 4-6 годин, при цьому пікові концентрації досягаються приблизно через 12-24 години після інфаркту. Той факт, що сТnI залишається підвищеним у сироватці набагато довше, що додається до його підвищеної діагностичної чутливості та серцевої специфічності, дозволяє виявляти ГІМ значно раніше після початку ішемії (4 години), а також діагностувати переоперативний інфаркт у ситуаціях, коли очікується високий рівень сироватки білків скелетних м'язів.

Крім того, останні дані виявили вимірну залежність між рівнем серцевого тропоніну та довгостроковим результатом після моменту дискомфорту в грудях. Дослідження показують, що використання сТnI демонструє високу прогностичну цінність у визначенні групи ризику нестабільної стенокардії пацієнтів, і що ці тести можуть бути особливо корисними для оцінки стану пацієнта до виписки з відділу інтенсивної терапії.

Імуноферментний аналіз сТnI забезпечує швидкий, чутливий і надійний аналіз для кількісного вимірювання серцево-специфічного тропоніну І. Розроблені для тесту антитіла визначатимуть мінімальну концентрацію 1,0 нг/мл, і немає перехресної реакції з серцевим тропоніном Т або скелетним тропоніном Т або І людини.

3 ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Тест сТnI ELISA є базується на принципі твердофазного імуноферментного аналізу. Система аналізу використовує чотири унікальних моноклональних антитіла, спрямованих проти різних антигенних детермінантів на молекулі. Для твердофазної іммобілізації (на мікротитрових лунках) використовуються три моноклональні антитіла миші проти тропоніну І. Четверте антитіло знаходиться в розчині антитіло-ферментний кон'югат (пероксидаза хрому). Досліджуваному зразку дозволяється реагувати одночасно з чотирма антитілами, в результаті чого молекули тропоніну І стискаються між твердою фазою та зв'язаними з ферментами антитілами. Після 90-хвилинної інкубації при кімнатній температурі лунки промивають водою, щоб видалити незв'язані мічені

антитіла. Додають розчин реагенту тетраметилбензидину (ТМВ) та інкубують протягом 20 хвилин, що призводить до утворення синього кольору. Розвиток кольору припиняється додаванням 1N соляної кислоти (HCl), змінюючи колір на жовтий. Концентрація тропоніну І прямо пропорційна інтенсивності забарвлення досліджуваного зразка. Поглинання вимірюється спектрофотометрично при 450 нм.

4 РЕАГЕНТИ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

1. **Лунки покриті антитілами** (1 планшет, 96 лунок)
Мікротитрові лунки покриті мишачим моноклональним анти-ТnI.
2. **Набір референсних стандартів** (1набір, 1.0 мл/флакон)
Містить 0, 2.0, 7.5, 30, та 75 нг/мл ТnI, ліофілізовані.
3. **Реагент ферментного кон'югату сТnI** (13 мл/флакон)
Містить мишаче моноклональне антитіло, кон'юговане з пероксидазою хрому у розчині Трис Буфер-БСА з консервантом.
4. **ТМВ реагент** (11 мл/пляшку)
Містить ТМВ розчин.
5. **Стоп-розчин** (11 мл/пляшку)
Містить розведену соляну кислоту (1N HCl).

5 НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

1. Деіонізована вода
2. Прецизійні піпетки: 5 мкл, 10 мкл, 50 мкл, 100 мкл та 1.0 мл
3. Одноразові наконечники для піпеток
4. Мікротитровий планшетний рідер (зі здатністю зчитування при 450 нм)
5. Вортексний мікшер, або еквівалент
6. Абсорбуючий папір
7. Графічний папір
8. Кардіомаркери Plus Tri Liq Контролі; Кат. №: 180 (Діагностична група лабораторій Bio-Rad, Геркулес, Канада 94547)

6 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

1. **ЗАСТЕРЕЖЕННЯ:** Даний набір містить людський матеріал. Вихідний матеріал, використаний для виробництва цього компоненту, був протестований та є негативним на HBsAg, ВіЛ 1/2 та HCV за FDA затвердженими методами. Однак, жоден метод не може повністю гарантувати відсутність цих агентів. Тому всі продукти крові людини, включаючи зразки сироватки, слід вважати потенційно інфекційними. Рекомендується, щоб поводження з реактивами та зразками пацієнтів здійснювалося згідно зі Стандартом OSHA щодо патогенів, що передаються через кров, або іншими відповідними національними вказівками щодо біологічної безпеки.
2. Уникати контакти з 1N HCl. Дана кислота може викликати подразнення шкіри та опіки. При попаданні, промити великою кількістю води та звернутися до лікаря, якщо подразнення не зникає.
3. Не використовувати реагенти після закінчення терміну придатності та перемішувати і не використовувати компоненти з різних наборів та з різними номерами лотів.
4. Одразу закрити флакони з реагентами. Не плутати ковпачки.
5. Не піпетувати реагенти ротом.
6. Тільки для діагностики *in vitro*.

7 УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

1. Зберігайте нерозкритий набір при температурі від 2 ° C до 8 ° C після отримання та коли він не використовується, до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці набору. Термін придатності дивитися на етикетці.
2. Зберігати мікротитровий планшет герметично запакованим з осушувачем, щоб мінімізувати попадання вологи.

8 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Перед використанням усі реагенти слід довести до кімнатної температури (18°C - 25°C).
2. Відновіть кожен ліофілізований стандарт 1,0 мл деіонізованої води. Дайте відновленому матеріалу постояти щонайменше 20 хвилин і обережно перемішайте. **Відновлені стандарти будуть стабільними до 21 дня при зберіганні в герметичній упаковці при температурі від 2 ° C до 8 ° C.** Утилізуйте відновлені Стандарти через 21 день. **Щоб забезпечити довгострокову (більше 21 дня) максимальну стабільність відновлених стандартів, їх слід аліквотувати та заморожувати (-20 ° C або нижче) одразу після досягнення відновлення. Кожен розділений на аліквоти Стандарт слід заморожувати та розморозувати лише один раз.**
3. Зразки з очікуваними концентраціями Тропоніну І понад 75 нг/мл можна кількісно оцінити шляхом розведення розчинником, доступним від постачальника.

9 ІНСТРУМЕНТАРІЙ

Зчитувач мікротитрових лунок з пропускнуою здатністю 10 нм або менше та діапазоном оптичної щільності від 0 до 3 ОЩ або більше при довжині хвилі 450 нм прийнятний для вимірювання абсорбції.

10 ПІДГОТОВКА ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

1. У цьому тесті рекомендується використовувати зразки СИРОВАТКИ.
2. Зразки слід збирати за допомогою стандартних методів венепункції. Видаліть сироватку з коагульованих або упакованих клітин *протягом 60 хвилин* після забору.
3. Зразки, які не можуть бути проаналізовані протягом 24 годин після збору, слід заморозити при -20°C або нижче, і вони будуть стабільними до шести місяців.
4. Уникайте сильно гемолітичних (яскраво-червоний), ліпемічних (молочний) або каламутних зразків (після центрифугування).
5. Зразки не слід багаторазово заморожувати та розморожувати перед тестуванням. НЕ зберігайте в морозильних камерах, що «не мають морозу», це може призвести до періодичного розморожування. Заморожені зразки та мутні та/або ті, що містять тверді частинки перед використанням необхідно центрифугувати.

11 ПРИМІТКИ ЩОДО ПРОЦЕДУРИ АНАЛІЗУ

1. Рекомендації щодо піпетування (одноканальний та багатоканальний): Піпетування всіх стандартів, зразків та контролів має бути завершено протягом 3 хвилин.
2. Усі стандарти, зразки та контролі повинні досліджуватися у двох примірниках з дотриманням однакових умов тестування.
3. Рекомендується зчитувати лунки протягом 15 хвилин після додавання Стоп-Розчину.

12 ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

1. Закріпіть необхідну кількість покритих лунок у штативі.
2. Додайте **100 мкл стандартів, зразків та контролів** у відповідні лунки.
3. Ретельно перемішайте протягом 10 секунд.
4. Додайте **100 мкл реагенту Ферментного Кон'югату** в кожну лунку.
5. Ретельно перемішайте протягом 30 секунд. На цьому етапі важливо провести повне змішування.
6. **Інкубуйте** при кімнатній температурі (18°C - 25°C) протягом **90 хвилин**.
7. Видаліть інкубаційну суміш, витрусивши вміст планшету у контейнер для відходів.
8. Промийте мікротитрові лунки 5 разів деіонізованою водою та струсіть їх. (Не використовуйте воду з крану).
9. Різно витрусіть лунки на абсорбуючий папір або на паперовий рушник, щоб видалити залишки вологи.
10. Додайте **100 мкл ТМБ реагенту** у кожну лунку. Бережно перемішайте протягом 10 секунд.
11. Інкубувати при кімнатній температурі протягом **20 хвилин**.
12. Зупиніть реакцію, додавши по **100 мкл Стоп-Розчину** в кожну лунку.
13. Обережно перемішайте протягом 30 секунд. **Необхідно, щоб синій колір повністю змінився на жовтий.**
14. Зчитуйте абсорбцію при 450 нм за допомогою мікротитрового зчитувача **впродовж 15 хвилин**.

13 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Належна лабораторна практика вимагає, щоб зразки контролю якості (контролі) тестувалися з калібрувальною кривою для перевірки ефективності аналізу. Для забезпечення належної продуктивності контрольний матеріал слід повторно аналізувати, щоб встановити середні значення та допустимі діапазони.

14 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

1. Визначте значення середньої абсорбції (OЩ_{450}) для кожного набору стандартів, зразків і контролів.
2. Побудуйте стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію для кожного референсного стандарту проти його концентрації у нг/мл на графічному папері, з абсорбцією на вертикальній осі У та концентрацією на горизонтальній осі Х.
3. Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка, визначте відповідну концентрацію Тропоніну I (нг/мл) зі стандартної кривої. Залежно від досвіду та/або наявності комп'ютерних можливостей можуть бути використані інші методи обробки даних.
4. Зразки пацієнтів з концентрацією сТnI більше 75 нг/мл слід розводити 10 разів розчинником для зразків тропоніну I від постачальника. Остаточні значення сТnI слід помножити на 10, щоб отримати результати сТnI у нг/мл .

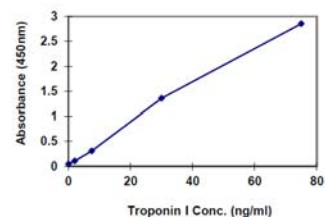
15 ПРИКЛАД СТАНДАРТНОЇ КРИВОЇ

Результати типового стандартного запуску з показаннями поглинаючої здатності при 450 нм, показані на осі Y проти концентрацій тропоніну I, показаних на осі X.

ПРИМІТКА. Ця стандартна крива призначена лише для ілюстрації та не повинна використовуватися для обчислення невідомого. Кожна лабораторія повинна надавати свої дані та стандартну криву в кожному експерименті.

Приклад стандартної кривої

сТnI (нг/мл)	Абсорбція (450 нм)
0	0.048
2.0	0.110
7.5	0.307
30	1.357
75	2.853



16 ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

1. Надійні та відтворювані результати будуть отримані, коли процедура дослідження проводитиметься з повним розумінням цієї інструкції, з дотриманням вимог професійної лабораторної практики.
2. Тільки для професійного використання. Діагностичні результати, отримані за допомогою ІФА сТnI, слід використовувати разом з іншими діагностичними процедурами та інформацією, доступною для лікаря; наприклад, додаткові клінічні випробування, ЕКГ, симптоми та клінічні спостереження.
3. Зразки сироватки, що показують сильну ліпемію, гемоліз або помутніння, не слід використовувати для цього тесту.
4. Процедура промивання є дуже важливою. Недостатнє промивання може вплинути на точність та дати помилково підвищені результати зчитування абсорбції.
5. Зразки пацієнтів можуть містити антитіла людини проти мишачих (НАМА), які здатні давати хибно підвищені або пригнічені результати за допомогою аналізів, які використовують мишачі моноклональні антитіла. Аналіз сТnI ELISA постачальника був розроблений для мінімізації втручання зразків, що містять НАМА; проте не можна гарантувати повне усунення цих перешкод від усіх зразків пацієнтів.
6. Результати тесту, що не відповідають клінічній картині та історії пацієнта, слід тлумачити обережно.
7. Якщо пристрій не працює, скористайтеся альтернативною діагностичною процедурою або зверніться до виробника.

17 ОЧІКУВАНІ РЕЗУЛЬТАТИ

Було проведено оцінку клінічних даних для визначення нормального очікуваного значення, а також клінічної чутливості та клінічної специфічності аналізу сТnI (див. нижче).

Двісті двадцять п'ять (225) здорових дорослих досліджували за допомогою тесту для встановлення нормального очікуваного значення, яке позначалося як $\leq 0,5 \text{ нг/мл}$ сТnI.

Усі значення нормальної популяції, що перевірялася, були нижче рівня чутливості аналізу ($1,0 \text{ нг/мл}$).

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановила свій власний діапазон норми на основі популяції пацієнтів, географії, дієти та факторів навколишнього середовища; так само необхідно враховувати сучасну практику та клінічні критерії діагностики ГІМ. Однак, на основі опублікованої літератури, діагностична межа для пацієнтів з ГІМ становить $1,5 \text{ нг/мл}$.

Будь-які стани, що призводять до пошкодження клітин міокарда, потенційно можуть підвищити рівень серцевого тропоніну-I вище очікуваного значення. Клінічно задокументовано, що ці стани включають нестабільну стенокардію, міокардит, застійну серцеву недостатність, кардіохірургію або інвазивне тестування.

ПРИМІТКА: для виявлення підвищених рівнів, може знадобитися серійний забір зразків.

18 КЛІНІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Було проведено клінічне дослідження, щоб визначити точність, а також діагностичну чутливість та специфічність сТnI ELISA порівняно з іншим наявним у продажу набором. Дані представлені нижче.

18.1 Клінічна кореляція

Статистичне дослідження з використанням 204 зразків сироватки пацієнта в діапазоні концентрацій сТnI від $0,7 \text{ нг/мл}$ до 595 нг/мл , проаналізованих за допомогою ІФА сТnI (від $0,5 \text{ нг/мл}$ до 484 нг/мл ; Abbott TnI MEIA), показало еквівалентну кореляцію з комерційно доступним набором, як показано нижче.

Порівняння тестів сТnI ELISA та Abbott AxSym® TnI дало наступні дані: Коефіцієнт кореляції = 0.9537

Уклон = 0.9063
 Перехоплення = -3.9875
 Середнє = 45.57 нг/мл
 Середнє Abbott = 50.37 нг/мл

Коли були вилучені зразки, які перевищували верхню межу аналізу Abbott (тобто > 50 нг/мл), спостерігали таку статистику. Зверніть увагу, що це було зроблено для того, щоб продемонструвати узгодженість між аналізами нерозведених зразків:

Коефіцієнт кореляції = 0.8672
 Уклон = 1.0416
 Перехоплення = 0.7816
 Середнє = 9.96 нг/мл
 Середнє Abbott = 12.72 нг/мл

18.2 Клінічна чутливість та специфічність

Із загальної кількості пацієнтів 149 (249 зразків), що аналізувалися під час дослідження, було 93 пацієнти, у яких було підтверджено, що вони перенесли ПІМ. На основі клінічного cut-off 1,5 нг/мл оцінювали діагностичну чутливість та специфічність аналізу cTnI.

Клінічна специфічність дорівнювала 87.5% (95% CI: 80.3% - 94.7%), тоді як чутливість становила 100%.

Результати цих досліджень показують, що ІФА набір cTnI має порівняну точність діагностики порівняно з іншими наборами, які є на ринку.

19 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

19.1 Чутливість

Мінімальна концентрація, що визначається при аналізі cTnI ELISA, виміряна методом 2SD із середнього значення нульового стандарту, оцінюється як 1,0 нг/мл. Крім того, було визначено, що функціональна чутливість становить 0,75 нг/мл (як визначено за допомогою аналізу %C.V. ≤10 %).

Нижня межа cTnI ELISA \approx 0.48 нг/мл cTnI; верхня межа = 1.0 нг/мл cTnI.

19.2 Хук-ефект

Не було виявлено хук-ефекту у цьому аналізі при концентраціях тропоніну I до 10 000 нг/мл.

19.3 Точність

19.3.1 Точність в аналізі

Точність в межах аналізу визначали шляхом повторного визначення чотирьох різних зразків сироватки в одному аналізі. Варіативність в межах аналізу показана нижче:

Зразок сироватки	1	2	3	4
К-сть повторів	20	20	20	20
Середнє cTnI (нг/мл)	5.93	24.3	44.9	89.8
CV	0.22	1.35	1.78	2.52
КВ (%)	3.7	5.6	4.0	2.8

19.3.2 точність між аналізами

Точність між аналізами визначали повторними вимірюваннями чотирьох різних зразків сироватки за серією індивідуально каліброваних аналізів. Варіативність між аналізами показана нижче:

Зразок сироватки	1	2	3	4
К-сть повторів	26	26	26	26
Середнє cTnI (нг/мл)	5.88	24.56	48.91	85.81
CV	0.28	1.14	2.23	3.76
КВ (%)	4.8	4.7	4.6	4.4

19.4 Специфічність

Нижче наведено тестування матеріалів на перехресну реакційну здатність у концентраціях до зазначених нижче рівнів. Перехресної реакції щодо будь-якого з компонентів не спостерігалося.

ПРОТЕСТОВАНИ МАТЕРІАЛИ	КОНЦЕНТРАЦІЯ ТЕСТУ
Тропонін С скелетних м'язів кролика	2.500 нг/мл
Серцевий тропонін Т людини	2.500 нг/мл
Тропонін Т скелетних м'язів людини	2.500 нг/мл
Тропонін І скелетних м'язів людини	2.500 нг/мл
Гемоглобін	1.2 г/дл
Білірубін	20 мг/дл
Холестерин	500 мг/дл
Тригліцериди	1.000 мг/дл
Загальний білок	10 г/дл

19.5 Дослідження відновлення та лінійності

19.5.1 Відновлення

Різні зразки сироватки пацієнта з відомими рівнями cTnI людини об'єднували і аналізували в двох примірниках. Середнє відновлення становило 93.3%.

Номер пари	Очікуване [cTnI] (нг/мл)	Отримане [cTnI] (нг/мл)	% відновлення
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%

19.5.2 Лінійність

Чотири зразки пацієнта серійно розводили, щоб визначити лінійність. Середнє відновлення становить 101.7%.

#	Dilution	Expected Conc. (ng/mL)	Observed Conc. (ng/mL)	% Expected
1.	Undiluted	----	----	----
	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%
Mean = 105.3%				
2.	Undiluted	----	----	----
	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%
Mean = 103.2%				
3.	Undiluted	----	----	----
	1:2	62.5	64.0	102.4%
	1:4	31.3	31.3	100.0%
	1:8	15.6	14.5	92.9%
	1:16	7.8	7.2	92.3%
	1:32	3.9	3.7	94.9%
	1:64	1.9	2.0	105.3%
	1:128	1.9	2.0	105.3%
Mean = 98.0%				
4.	Undiluted	----	----	----
	1:2	86.4	88.0	101.9%
	1:4	43.2	43.1	99.8%
	1:8	21.6	21.7	100.5%
	1:16	10.8	10.2	94.4%
	1:32	5.4	5.4	100.0%
	1:64	2.7	2.8	103.7%
	1:128	2.7	2.8	103.7%
Mean = 100.1%				

20 СТАНДАРТИЗАЦІЯ

Комплекс тропоніну I-T-C людини був отриманий від кваліфікованого постачальника, а концентрацію cTnI було визначено. Далі матеріал розбавляли розчинником для зразків cTnI і служив «Стандартним стоковим розчином» для приготування референсних Наборів Стандартів cTnI. Цільове значення "Стандартного стокового розчину" було підтверджено імунологічним аналізом Abbott AxSym Тропонін I.



ВИРОБНИК

ДРГ Інструментс ГмбХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drq-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

