НАБОР ИФА

ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИОГЛОБИНА

1667-18, Myoglobin

*Каталог. № : **1667-18*** *Методика от **22-07-2002***
*Количество : **96***
*Производитель: **DAI (США)***

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

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения миоглобина в сыворотке человека.

Только для диагностики in vitro
Хранить при 2-8^{0}C

ПРИНЦИП МЕТОДА

Myoglobin ELISA есть твердо-фазовый ферментно-связанный иммуносорбентный анализ. В анализе используются одно моноклональное антитело, направленное против дистинктной антигенной детерминанты на молекуле миоглобина. Мышиное моноклональное антитело используется для иммобилизации на солидной фазе (на микропланшетных ячейках). Козлиное анти-миоглобин антитело находиться в растворе антитело-ензим (пероксидаза хрена) коньюгате. Образец теста одновременно реагирует с двумя антителами, в результате молекулы миоглобина оказываются в сендвиче между солидной фазой и ензимно-связанными антителами. После 45 минутной инкубации при комнатной температуре, ячейки промываются для удаления несвязанных меченых антител. Добавляется TMB реагент и инкубируется 20 минут, в результате развивается голубой цвет. Развитие цвета останавливается добавлением стоп раствора, что изменяет цвет на желтый. Концентрация миоглобина прямо пропорциональна интенсивности цвета в образце. Абсорбция измеряется спектрофотометрически при 450 нм.

РЕАГЕНТЫ И ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. **Планшетка** с привитыми мышиными моноклональными анти-миоглобин на 96 лунок.
2. **Набор стандартов: 1 набор, 1,0 мл/фл,** содержащий 0, 25, 100, 250, 500 и 100 нг/мл миоглобина, жидкие. Готовые к использованию. **Эти стандарты предварительно разбавлены 10-кратно. Не разбавлйте их перед использованием.**
3. **Разбавитель образцов** – 25 мл/фл. Содержит бычью сыворотку и 1,0 % (w/v) Проклин в качестве консерванта.
4. **Ферментный коньюгат**, **22 мл/фл,** содержащий анти-миоглобин коньюгированный к пероксидазе хрена в растворе Tris буфера-BSA с консервантами
5. **Реагент TMB**, **11 мл/бут.,** содержащий раствор TMB.
6. **Стоп раствор, 1 бут., 11 мл/бут.,** содержащий разбавленную 1N HCl**.**

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Точные пипетки: 20, 50, 200 мкл и 1,0 мл.
2. Наконечники к пипеткам.
3. Дистиллированная вода.
4. Вортекс или эквивалент.
5. Абсорбирующая бумага.
6. Графическая бумага.
7. Микропланшетный ридер

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Обращайтесь с реагентами и образцами как с потенциально инфицированными.
2. Избегайте контакта с стоп раствором. Это может вызывать ожег. 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^{0}C до окончания срока пригодности, указанного на ярлыке.
2. Храните планшет в запечатанном пакете с осушителем для минимизации попадания воздуха.

ИНСТРУМЕНТАРИЙ

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

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. Все реагенты следует привести к комнатной температуре (18-25^{0}C) перед использованием.
2. **Сыворотку пациента и контрольную сыворотку необходимо развести 10 кратно. Приготовьте серии маленьких пробирок (как 1,5 мл центрифужных пробирок) и смешайте 20 мкл сыворотки с 180 мкл (0,18 мл) разбавителя образца. НЕ РАЗБАВЛЯЙТЕ СТАНДАРТЫ.**
3. Сыворотка пациента с ожидаемой концентрацией выше, чем 1000 нг/мл должна быть дальше 10-кратно разбавлена разбавителем.

СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. В этом тесте используются образцы СЫВОРОТКИ.
2. Образцы необходимо собрать, используя стандартную технику венопунктуры. 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^{0}C или ниже. Они остаются стабильны 6 месяцев.
4. Избегайте повторных циклов замораживания / оттаивания образцов. Не храните в холодильнике с системой само размораживания.
5. Образцы, которые после замораживания являются мутными или содержать частицы, должны быть центрифугированы.

ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

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

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Сыворотку пациента и контрольную сыворотку необходимо развести 10 кратно. Приготовьте серии маленьких пробирок (как 1,5 мл центрифужных пробирок) и смешайте 20 мкл сыворотки с 180 мкл (0,18 мл) разбавителя образца. НЕ РАЗБАВЛЯЙТЕ СТАНДАРТЫ.

1. Поместите необходимое количество ячеек в держатель.
2. Внесите 20 мкл стандартов, разбавленных образцов и контролей в соответствующие ячейки.
3. Внесите 200 мкл реагента энзимного конъюгата в каждую ячейку.
4. Тщательно перемешайте 30 секунд. Очень важно добиться полного смешивания.
5. Инкубируйте при комнатной температуре (18-25^{0}C) 45 минут.
6. Удалите инкубационный раствор в контейнер для отходов.
7. Промойте ячейки 5 раз дистиллированной водой. Не используйте вод из-под крана.
8. Резко переверните ячейки на абсорбирующую бумагу. Для удаления остатков воды.
9. Внесите 100 мкл TMB раствора в каждую ячейку. Легко перемешайте 5 секунд.
10. Инкубируйте 20 минут при комнатной температуре.
11. Остановите реакцию добавлением 100 мкл стоп раствора в каждую ячейку.
12. Легко перемешайте 30 секунд. **Важно добиться, чтоб голубой цвет полностью изменился на желтый.**
13. Считайте абсорбцию при 450 нм микропланшетным ридером при 450 нм в **течении 15 минут.**

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

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

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Вычислите значение средней абсорбции ($ОП_{450}$) для каждого набора стандартов, контролей и образцов.

2. Постройте стандартную кривую, откладывая среднюю абсорбцию, полученную для каждого стандарта против его концентрации в нг/л на графической бумаге, с абсорбцией на оси у и концентрацией на оси х.
3. Используя среднюю абсорбцию для каждого образца, определите соответствующую концентрацию миоглобина (нг/мл) со стандартной кривой.
4. Поскольку стандарты уже разбавлены 10- кратно, нет необходимости умножать значения для образцов и контролей на фактор разбавления. Однако, если образцы разбавлялись 100-кратно, полученные значения должны быть умножены на 10.

ПРИМЕР СТАНДАРТНОЙ КРИВОЙ

Результаты типичного стандартного теста с абсорбцией, считанной при 450 нм, показанной на оси у против концентрации миоглобина на оси х. Эта стандартная кривая только для иллюстрации и не должна использоваться для вычисления результатов. Каждая лаборатория должна устанавливать собственные данные и стандартную кривую в каждом эксперименте.

Миоглобин (нг/мл)	Абсорбция (450 нм)
0	0,071
2	0,235
100	0,632
250	1,169
500	1,845
1000	3,357

Пример типичной стандартной кривой смотрите в оригинале инструкции на англ. языке.

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. Процедура промывания – критична. Недостаточное промывание может привести к неточным результата.
4. Образцы пациентов могут содержать человеческие анти-мышиные антитела (HAMA), что могут влиять на результаты. Данный набор разработан для минимизирования влияния HAMA-содержащих образцов. Но, полного исключения этого влияния мы не можем гарантировать.
5. Результаты, что не соответствуют клинической картине или истории пациента должны интерпретироваться с осторожностью.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

- Нормальный уровень миоглобина в сыворотке находится в диапазоне 12-100 нг/мл. Значения слегка увеличиваются с возрастом.
- Использование Миоглобин ELISA, было проведена оценка клинических данных для определения нормальных значений. Изучение дало нормальный диапазон величин в соотношении со стандартами. 83 очевидно здоровых взрослых были проанализированы для установления ожидаемых нормальных значений. Установленный диапазон составляет 8,1-54,5 нг/мл.
- Каждый специалист должен установить собственный нормальный диапазон. Другие факторы также должны учитываться как повреждение скелета или сердечного мускула увеличить уровень миоглобина.

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

КЛИНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Было проведено клиническое изучение для определения точности миоглобин ELISA при сравнении с Abbott AxSym Myoglobin MEIA. Данные представлены ниже.

1. Клиническое соотношение:

Статистическое изучение 150разцов сыворотки человека, при концентрации миоглобина т 37 нг/мл до 919,8 нг/мл, демонстрирует соотношение с коммерческим набором 13,0 нг/мл до 1011,0 нг/мл; Abbot AxSym®), что показано ниже:

Сравнение данного набора с Abbot AxSym тестом дало следующие данные:

Коэффициент корреляции = 0,9392
Отклонение = 0,9948
Пересечение: = 55,051
Среднее = 287,9 нг/мл
Среднее Abbote = 262,5 нг/мл

Чувствительность

Минимально определяемая концентрация миоглобина равна 5 нг/мл.

Побочный эффект

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

Точность

Внутри тестовая точность была определена тестированием пяти разных сывороток в одном анализе.

Образец сыворотки	1	2	3	4	5
№ 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

Междутестовая точность была определена измерением пяти разных образцов сыворотки при индивидуальных калибрированных тестах.

Образец сыворотки	1	2	3	4	5
№ 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

Изучение линейности и восстановления

Восстановление

Разные образцы сыворотки с известным уровнем миоглобина были скомбинированы и проанализированы в дубликате. Среднее значение восстановления равно 102,8%

Номер партии	Ожидаемые значения миоглобина (нг/мл)	Полученные значения миоглобина (нг/мл)	% восстановления
1	280	25	89,3
2	451	495	109,8
3	255	241	94,5
4	269	300	111,5
5	39	41	105,1
6	240	231	96,0
7	92	88	95,9
8	209	214	102,0
9	340	328	96,0
10	214	213	100,0
11	551	655	118,8
12	431	436	101,2
13	757	824	108,8
14	747	768	102,8
15	780	894	114,6
16	575	569	98,9

Специфичность

Следующие аналиты были тестированы на перекрестную реактивность при указанной концентрации. Не наблюдалось перекрестной реактивности со следующими компонентами. Смотрите оригинал инструкции на англ. языке, стр. 4.:

Линейность

Образцы трех пациентов были последовательно разбавлены для определения линейности. Среднее восстановление составило 105.8%. Линейность смотри в оригинале инструкции на англ. языке.

СТАНДАРТИЗАЦИЯ

Человеческий миоглобин комплекс был получен из качественного материала и была определена концентрация миоглобина. Материал был дальше разбавлен миоглобин 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.

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

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»