

# НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРОПОНИНА I В СЫВОРОТКЕ ЧЕЛОВЕКА

## EIA-2952, Troponin I ELISA

Каталог. № : EIA-2952  
Количество : 96  
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 11-02-2015  
Версия 6.0



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

### ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор сTnI ELISA предназначен для количественного определения кардиального тропонина I в сыворотке человека. Измерение тропонина I представляет большую ценность для диагностики острого инфаркта миокарда (ОИМ).

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ПОЯСНЕНИЯ К ИССЛЕДОВАНИЮ

Тропонин – это комплекс ингибиторных или контрактильных протеинов поперечно-полосатой мускулатуры. Он расположен вдоль тонкого филамента миоцитов и состоит из трех различных протеинов: Тропонин I, Тропонин C, и Тропонин T. В свою очередь Тропонин I существует в трех различных изоформах; две в волокнах быстрых и медленных скелетных мышц, и одна в кардиальной мускулатуре. Около 40% участков аминокислотной цепи кардиальной изоформы (сTnI) являются специфичными для этого белка. С TnI имеет молекулярный вес 22,500 дальтон, а так же 31 дополнительный аминокислотный остаток, которые не присутствуют в изоформах скелетной мускулатуры. Антитела, вырабатываемые против кардиальной изоформы иммунологически отличаются от антител вырабатываемых против двух других скелетных изоформ, а уникальная изоформа и специфичность ткани кардиального тропонина I является основой для их использования в диагностике ОИМ. Кардиальный тропонин I (сTnI) имеет большую диагностическую ценность для пациентов отделений скорой помощи поступающих с болью в груди. ИМ диагностируется, когда уровень в крови чувствительных и специфичных биомаркеров, таких как кардиальный тропонин, МВ фракция креатинкиназы (КФК-МВ), и миоглобин, повышены при клинической картине острой ишемической болезни. Наиболее новый и широко применяемый биомаркер для диагностики повреждений миокарда – это кардиальный тропонин (I или T). Кардиальные тропонины показывают миокардиальную специфичность ткани и высокую чувствительность. Так же кардиальный TnI и КФК-МВ имеют идентичные механизмы высвобождения (4-6 часов после приступа боли), но уровень TnI остается повышенным значительно дольше (6-10 дней), что дает возможность расширения диагностического окна для определения кардиальной травмы. Нормальный уровень сTnI в крови очень низок. После приступа ОИМ уровень сTnI значительно повышается и могут быть выявлены в сыворотке в течение 4 - 6 часов, с достижением пиковой концентрации приблизительно через 12 - 24 часа после инфаркта.

Тот факт, что сTnI остается повышенным в сыворотке в течение долгого времени, в сочетании с его повышенной диагностической чувствительностью и кардиальной специфичностью позволяет выявить ОИМ намного раньше после приступа ишемической болезни (4 часа), а так же выявить интраоперативный инфаркт в случаях, когда ожидается высокий уровень протеинов скелетной мускулатуры в сыворотке. В дополнение к этому, недавние данные показали измеряемую связь между уровнями кардиального тропонина и продолжительными последствиями эпизодов недомоганий в грудной клетке.

Результаты исследований предполагают, что использование сTnI демонстрирует высокую прогностическую ценность для выделения группы высокого риска у нестабильных пациентов с ангиной, и, что эти тесты могут представлять ценность для оценки состояния пациента перед выпиской из отделения скорой помощи. Иммуноферментный метод исследования сTnI является быстрой, высокочувствительной и надежной методикой количественного определения кардиоспецифичного тропонина I. Антитела, разработанные для анализа, определяют минимальную концентрацию, равную 1.0 ng/ml, при отсутствии кросс-реактивности с кардиальным тропонином T или тропонином T или I скелетной мускулатуры.

### ПРИНЦИП АНАЛИЗА

ИФА-тест сTnI ELISA основан на принципе твердофазного иммуносорбентного анализа с ферментной меткой. Тест система использует 4 уникальных моноклональных антитела на отдельные антигенные детерминанты молекулы сTnI. Три мышинных моноклональных антитела к тропонину I используются для иммобилизации твердой фазы (на лунках). Четвертое антитело – в растворе конъюгата пероксидазы хрена. Тестовый образец реагирует одновременно с 4-мя антителами, в результате чего молекулы тропонина I оказываются между антителами твердой фазы и антителами с ферментной меткой (принцип сэндвича). После 90 минут инкубации при комнатной температуре, лунки промываются для удаления несвязанных меченых антител. Затем добавляется ТМБ субстрат, инкубируется в течение 20 минут, что приводит к появлению синего окрашивания. Проявления окрашивания останавливается добавлением HCl, что приводит к изменению окрашивания на желтое. Концентрация тропонина I прямо пропорциональна интенсивности окрашивания тестового образца. Абсорбция определяется спектрофотометрически при длине волны 450 nm.

### РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ НАБОРА

1. **Лунки, покрытые антителами** (мышинными моноклональными к TnI) (1 планшет, 96 лунок).
2. **Набор референтных стандартов** (1 набор, 1.0 мл/флакон). Содержит 0, 2.0, 7.5, 30, и 75 нг/мл TnI, лиофилизированный.
3. **Реагент Ферментного Конъюгата сTnI** (13 мл/флакон). Содержит мышинное моноклональное антитело к TnI, конъюгированное с пероксидазой хрена в Tris – буферном растворе БСА с консервантом.
4. **ТМБ Реагент** (11мл/флакон). Содержит готовый к использованию ТМБ раствор.
5. **Стоп-раствор** (11 мл/флакон). Содержит разведенную 1N HCl.

### МАТЕРИАЛЫ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ

1. Дистиллированная или деионизированная вода.
2. Прецизионные пипетки 5 мкл, 10 мкл, 50 мкл, 100 мкл и 1.0 мл.
3. Одноразовые наконечники к пипеткам.
4. Микропланшетный ридер, длина волны 450 nm.
5. Вortexный миксер или эквивалент.
6. Абсорбирующая бумага.
7. Миллиметровая бумага.
8. Положительные Контроли.

## ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. **Предупреждение:** Этот набор содержит материал человеческого происхождения. Источник показал отрицательный результат на HBsAg, HIV 1/2 и HCV по методам одобренным FDA. Однако, не существует методов, гарантирующих полное отсутствие этих веществ. Поэтому, все продукты человеческой крови, включая образцы сыворотки, должны считаться потенциально опасными. Рекомендуется работать с реагентами и образцами пациентов согласно стандарту OSHA (Bloodborne Pathogens) другим подходящим правилам по безопасности работы с биологически опасными веществами.
2. Избегать контакта с 1N HCl. Может вызвать раздражения и ожоги кожи. В случае попадания кислоты на кожу, обильно промыть водой.
3. Не использовать реагенты с истекшим сроком годности и не смешивать реагенты с разными номерами лотов.
4. Сразу закрывать флаконы с реагентами. Не путать колпачки.
5. Не пипетировать ртом.
6. Для диагностики in-vitro.

## УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

1. Невскрытый набор хранить при 2-8 °C до даты срока годности, указанного на этикетке набора.
2. Микротитровальный планшет хранить герметично закрытым с влагопоглотителем, во избежание увлажнения.

## ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Перед использованием все реагенты довести до комнатной температуры (18-25 °C).
2. Восстановить лиофилизированные стандарты 1.0 мл дистиллированной воды. Дать постоять 20 минут и осторожно смешать. **Восстановленные стандарты стабильны до 21 дня при хранении плотно закрытыми при 2-8 °C.** По истечении 21 дня восстановленные стандарты непригодны для использования. **Для обеспечения максимальной стабильности восстановленных стандартов, необходимо хранить их в аликвотах замороженными (-20 °C или ниже) сразу после восстановления. Каждый разделенный на аликвоты стандарт нельзя повторно замораживать.**
3. Образцы с ожидаемыми концентрациями Тропонина I более 100 нг/мл можно развести раствором для разведения, предоставляемым продавцом.

## ИНСТРУМЕНТЫ

Микропланшетный ридер с пропускной способностью 10 нм или менее и диапазоном 0 - 3 OD или более при длине волны 450 nm.

## ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. Для данного исследования должна использоваться сыворотка.
2. Образцы должны отбираться способом стандартной венопункции. Выделить сыворотку из свернувшейся крови в течение 60 минут после взятия крови.
3. Образцы, которые не исследованы в течение 24 часов после взятия крови, следует заморозить при -20 °C или ниже. Замороженные образцы стабильны до шести месяцев.
4. Избегать сильно гемолизированных (ярко-красных), липемичных (молочного вида), или мутных образцов (после центрифугирования).
5. Недопустимо повторно замораживать или размораживать образцы перед исследованием. Не хранить в морозильниках «без инея», что может привести к случайному размораживанию. Замороженные образцы, а так же мутные и/или содержащие частицы, необходимо отцентрифугировать перед использованием.

## ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Пипетирование всех стандартов, образцов и контролей должно производиться в течение не более 3 минут.
2. Все стандарты, образцы и контроли должны исследоваться дублировано с соблюдением одинаковых условий тестирования.
3. Рекомендуется считать показания ОП лунок в течение 15 минут после добавления стоп-раствора.

## ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Установить требуемое количество лунок в держатель.
2. Раскапать **100 мкл стандартов, образцов, контролей** в соответствующие лунки.
3. Осторожно перемешать в течение 10 секунд.
4. Раскапать **100 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) **90 минут**.
7. Удалить инкубированную смесь, вытряхнув содержимое лунок контейнер для мусора.
8. Промыть и вытряхнуть лунки 5 раз дистиллированной водой. НЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ВОДУ ИЗ-ПОД КРАНА.
9. Резко вытряхнуть содержимое лунок на впитывающую бумагу для удаления остатков влаги.
10. Раскапать **100 мкл ТМБ реагента** в каждую лунку. Осторожно смешивать 10 секунд.
11. **Инкубировать** при комнатной температуре **20 минут**.
12. Остановить реакцию добавлением **100 мкл стоп-раствора** в каждую лунку.
13. Осторожно смешивать 30 секунд. **Необходимо, чтобы синее окрашивание полностью сменилось на желтое.**
14. Считать абсорбцию при 450 нм с помощью микропланшетного ридера **в течение 15 минут**.

## КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Хорошая лабораторная практика требует использования контролей для каждого исследования и построения калибровочной кривой, чтобы удостовериться в нормальной работе набора. Для обеспечения надлежащей работы набора, контрольный материал должен многократно тестироваться, для установления средних значений и приемлемых диапазонов.

## ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

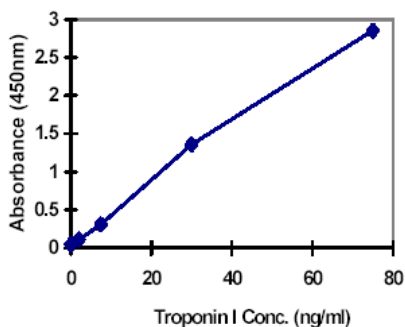
1. Подсчитать средние значения абсорбции для (OD 450) для каждого комплекта референс – стандартов, контролей и образцов.
2. Построить на миллиметровой бумаге стандартную кривую, откладывая средние значения абсорбции, полученные для каждого референс-стандарта, против его концентрации в нг/мл, где абсорбция откладывается на оси (y), а концентрация – на оси (x).
3. Используя среднее значение для каждого образца, определить соответствующую концентрацию Тропонина I (нг/мл) по стандартной кривой. В зависимости от практического опыта и возможности применения компьютера, можно использовать другие методы обработки информации.
4. Образцы пациентов с концентрациями cTnI более 75 нг/мл должны разводиться 10-кратно раствором для разведения образцов, предоставляемым поставщиком. Для получения результатов в нг/мл необходимо умножить на 10 окончательные значения cTnI.

### ПРИМЕР СТАНДАРТНОЙ КРИВОЙ

Результаты типичной стандартной кривой построенной по показаниям абсорбции при ДВ 450 нм показаны на оси Y против концентраций Тропонина I, показанной на оси X.

**Примечание:** Данная стандартная кривая приведена с целью иллюстрации и НЕ должна использоваться для вычисления неизвестных. Каждая лаборатория должна получить свои данные и стандартную кривую при каждом исследовании.

cTnI (ng/ml)	Absorbance (450 nm)
0	0.048
2.0	0.110
7.5	0.307
30	1.357
75	2.853



### ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. Надежный и воспроизводимый результат может быть получен при соблюдении данной инструкции и правил работы в лаборатории.
2. Диагностический результат, полученный в ходе анализа сTnI ELISA должен использоваться в сочетании с другими диагностическими процедурами и информацией, доступной специалисту, такой как дополнительное клиническое тестирование, ЭКГ, симптомы и клинические наблюдения.
3. Не использовать образцы с сильной липемией, гемолизом, или турбидностью.
4. Процедура промывки очень важна. Недостаточная промывка может отразиться на результатах.
5. Образцы пациентов могут содержать НАМА, которые могут привести к завышению или занижению результатов в анализах, в которых используется мышиное моноклональное антитело. Набор ИФА сTnI ELISA был разработан таким образом, чтобы минимизировать вмешательство НАМА; однако нельзя полностью исключить возможность влияния на результат образцов пациентов с НАМА.
6. Результаты теста не соответствующие клинической картине или истории болезни следует трактовать с особой осторожностью

### ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

С целью определения нормальных ожидаемых значений была поведена оценка клинических данных, а так же клинической специфичности и чувствительности при исследовании поставщиком сTnI (см. ниже.) У 225 здоровых взрослых пациентов была исследована сыворотка с использованием теста для определения нормальных ожидаемых значений, в результате  $\leq 0.5$  нг/мл сTnI. Все значения нормальных пациентов были ниже уровня чувствительности набора (1.0 нг/мл). Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала собственный диапазон нормальных значений, основанный на демографических данных, текущей практике, и клинических данных по диагнозу ОИМ. Однако, по данным опубликованных исследований, диагностический cut-off для пациентов с ОИМ определен следующий: 1.5 нг/мл.

Любые условия, приводящие к повреждению клеток миокарда могут повысить уровень кардиального тропонина-I (выше нормальных значений). Эти условия были клинически зафиксированы и включают нестабильную ангину, миокардит, закупорку сердечных сосудов, а также сердечную хирургию и инвазивное тестирование.

**ЗАМЕЧАНИЕ:** для определения завышенных уровней может потребоваться серийный отбор проб.

### КЛИНИКА

Было проведено клиническое исследование с целью определения точности, диагностической чувствительности и специфичности набора TnI ELISA в сравнении с другими коммерческими наборами. Данные приведены ниже.

#### 1. Клиническая корреляция

Клиническое исследование образцов сыворотки от 204 клинических пациентов (диапазон концентраций сTnI 0.7 нг/мл - 595 нг/мл), при анализе Abbott TnI MEIA сTnI ELISA (0.5 нг/мл - 484 нг/мл) показал эквивалентную корреляцию с коммерческим набором:

СРАВНЕНИЕ сTnI ELISA и Abbott AxSym TnI тестов дало следующие данные:

коэффициент корреляции = 0.9537

Угловой коэффициент = 0.9063

Угловой коэффициент = -3.9875

Среднее = 45.57 нг/мл

Среднее Abbott = 50.37 нг/мл

После удаления образцов, которые, по результатам теста Abbott показали концентрацию выше верхнего предела (i.e., > 50 нг/мл), наблюдалась следующая статистика. Это было сделано для демонстрации соответствия между исследованиями неразведенных образцов:

Коэффициент корреляции = 0.8672

Угловой коэффициент = 1.0416

Угловой коэффициент = 0.7816

Среднее = 9.96 нг/мл

Среднее Abbott = 12.72 нг/мл

## 2. Клиническая чувствительность и специфичность

Из общего числа пациентов (149) (249 образцов) анализируемых в ходе исследования, у 93 пациентов подтвердился перенесенный ОИМ. На основании клинического cut off равного 1.5 нг/мл, оценивалась диагностическая чувствительность и специфичность набора cTnI. клиническая специфичность была равна 87.5% (95%CI: 80.3% - 94.7%), в то время чувствительность = 100%. Результаты этих исследований показывают, что ИФА набор cTnI ELISA имеет вполне сопоставимую точность по отношению к другим наборам, присутствующим на рынке.

## РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 1. Чувствительность

Минимальный выявляемый уровень концентрации анализа cTnI ELISA измеряется посредством 2SD от среднего значения нулевого стандарта и равен 1.0 нг/мл. Дополнительно, функциональная чувствительность равна 0.75 нг/мл (%C.V. в анализе ≤ 10%).

**Нижний предел cTnI ELISA  $\geq$  0.48 нг/мл cTnI;**

**верхний предел = 1.0 нг/мл cTnI.**

### 2. Хук-эффект

Не был выявлен при концентрациях тропонина I до 10,000 нг/мл.

### 3. Точность

*Точность внутри анализа*

Точность «внутри» одного исследования определялась постановкой нескольких репликатов 4 различных образцов сывороток. Данные ниже: (См. таблицу в оригинале инструкции).

*Точность между анализами*

Определена многократными измерениями шести различных образцов сывороток в ходе нескольких индивидуально калиброванных исследований: (См. таблицу в оригинале инструкции).

### 4. Специфичность

Следующие материалы были исследованы на кросс-реакцию при концентрациях указанных в таблице. Ни в одном из компонентов не выявилась способность к кросс - реакции.

MATERIAL TESTED	TEST CONCENTRATION
Rabbit skeletal muscle troponin C	2,500 ng/ml
Human cardiac troponin T	2,500 ng/ml
Human skeletal muscle troponin T	2,500 ng/ml
Human skeletal muscle troponin I	2,500 ng/ml
Hemoglobin	1.2 g/dl
Bilirubin	20 mg/dl
Cholesterol	500 mg/dl
Triglyceride	1,000 mg/dl
Total Protein	10 g/dl

## 5. Восстановление и изучение линейности

### a. Восстановление

Различные образцы сыворотки с известными уровнями Тропонина I были исследованы в дубликатах. Среднее восстановления равно 93,3%

PAIR NO.	EXPECTED [cTnI] (ng/ml)	OBSERVED [cTnI] (ng/ml)	% RECOVERY
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%

### b. Линейность

Четыре образца были многократно разведены для определения линейности. Среднее восстановление равно 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	----	----	----
	1:4	62.5	64.0	102.4%
	1:8	31.3	31.3	100.0%
	1:16	15.6	14.5	92.9%
	1:32	7.8	7.2	92.3%
	1:64	3.9	3.7	94.9%
	1:128	1.9	2.0	105.3%
Mean = 98.0%				
4.	Undiluted	----	----	----
	1:2	----	----	----
	1:4	86.4	88.0	101.9%
	1:8	43.2	43.1	99.8%
	1:16	21.6	21.7	100.5%
	1:32	10.8	10.2	94.4%
	1:64	5.4	5.4	100.0%
	1:128	2.7	2.8	103.7%
Mean = 100.1%				



**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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)