



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

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

*Методика от 02-11-2007*

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

**ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO**

**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**

Тест 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. Козы 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. Микротитровальные лунки (1 планшет/96 лунок) покрытые мышиными моноклональными антителами к миоглобину,
2. Референтные стандарты (1 мл / флакон, 1 набор). Содержат 0, 25, 100, 250, 500 и 1000 нг/мл миоглобина. Жидкие, готовы к использованию. **Эти стандарты предварительно разведены 10-кратно. Не разводите повторно!**
3. Раствор для разведения образцов (25 мл/бутылка) Содержит бычью сыворотку 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, 1.0 мл
- одноразовые наконечники для пипеток
- дистиллированная вода
- Вортекс-миксер или аналог
- Впитывающая бумага / салфетка
- миллиметровая бумага
- микропланшетный ридер

**МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ**

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.

**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.
2. Микротитрационный планшет хранить в герметично закрытом пакете с влагопоглотителем.

**ИНСТРУМЕНТРИЙ**

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**

1. Все реагенты необходимо довести до комнатной температуры (18-25°C).
2. **Сыворотки пациента и контрольные сыворотки необходимо развести 10-кратно перед использованием. Приготовить несколько небольших пробирок (пробирки 1.5 мл для центрифуги) и смешать 20 мл сыворотки с 180 мкл (0.18 мл) раствора для разведения образцов. НЕ РАЗВОДИТЬ СТАНДАРТЫ!**
3. Образцы с предполагаемой концентрацией миоглобина более 1000 нг/мл можно развести раствором для разведения образцов в 10 раз.

**СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ**

1. Для этого исследования необходимо использовать образцы сыворотки.
2. Образцы можно собрать методом стандартной венепункции. Удалить сыворотку из коагулированных или свернувшихся в течение 1 часа после сбора.
3. Образцы которые невозможно исследовать в течение 24 часов после забора необходимо заморозить до -20°C или ниже, которые будут оставаться стабильными до 6 мес.
4. Перед использованием образцы нельзя многократно замораживать или размораживать. НЕ ХРАНИТЬ в саморазмораживающихся морозильниках, т.к. это может привести к случайному размораживанию.
5. Замороженные образцы и образцы с твердым осадком (или мутные) необходимо отцентрифугировать перед использованием.

**ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ**

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

1. Квалифицированная лабораторная практика требует, чтобы образцы (контроли) контроля качества использовались в каждой калибровочной кривой для проверки эффективности анализа.
2. для обеспечения надлежащей работы контрольный материал следует анализировать повторно для установления средних значений и приемлемых диапазонов.

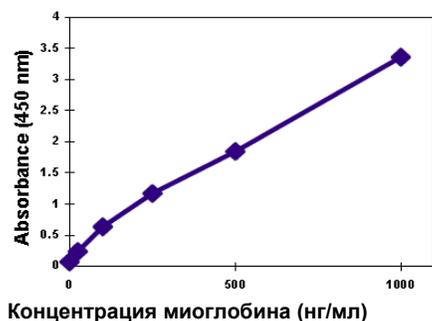
#### ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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 разводились в 100 раз, полученные значения необходимо умножить на 10.

#### ПРИМЕР СТАНДАРТНОЙ КРИВОЙ

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

Миоглобин (нг/мл)	Абсорбция (450 нм)
0	0.071
25	0.235
100	0.632
250	1.169
500	1.845
1000	3.357



#### ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. Надежные и воспроизводимые результаты достигаются при условии четкого следования данной инструкции и хорошей лабораторной практики.
2. Процедура промывки очень важна. Некачественная промывка привет к низкой точности результатов и завышенным значениям абсорбции.
3. Результаты, полученные в ходе использования данного набора можно использовать только в качестве дополнения к другим диагностическим процедурам и информации лечащего врача.
4. 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

1. Нормальный уровень миоглобина в сыворотке равен от 12 до 100 нг/мл. С возрастом наблюдается незначительное повышение.
2. Диапазон нормы гемоглобина после проведения определенных исследований был от 8,1 до 54,5 нг/мл миоглобина.
3. 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

##### 1. 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

Сдвиг = 0.9948

Пересечение = 55.051

Среднее = 287.9 нг/мл

Среднее Abbott Myoglobin = 262.5 нг/мл

##### 2. Чувствительность

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

##### 3. «Хук-эффект»

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

##### 4. 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 репликатов	20	20	20	20	20
Среднее миоглобина (нг/мл)	55.6	214.	294.	505.	1,43
		3	9	9	7
CO	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.com](mailto:info@diameb.com)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)