МИОГЛОБИНОВЫЙ ТЕСТ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФАРКТА МИОКАРДА

ИНФОРМАЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Нижний Новгород
2007

Лапшина Г.П., к.б.н., ООО ”НПО "Диагностические системы"
Блинова Т.В., д.м.н., ООО ”НПО "Диагностические системы"
Ротт Г.М., к.х.н.
Издание 2-ое, дополненое.
Печатается по “Новые возможности диагностики инфаркта миокарда - исследование миоглобина в биологических жидкостях” методические рекомендации, Москва, 1989

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение 4

2. Краткая характеристика миоглобина и его физиологических функций 4

3. Методы определения миоглобина.
Отличительные особенности набора «ДС-ЭРИТРО-МИОГЛОБИН» 6

4. Миоглобин в крови и в моче при инфаркте миокарда 8

5. Практические приемы работ с тест-набором "ДС-ЭРИТРО-МИОГЛОБИН" 14

5.1. Общая характеристика диагностического тест-набора 14

5.2. Визуальный контроль качества диагностикума 15

5.3. Материалы и оборудование, требуемое для хранения и использования диагностикума 15

5.4. Контроль специфической активности диагностикума 15

5.4.1. Процедура гемагтлютинационного теста 15

5.4.2. Учет результатов анализа 17

5.5 Экспресс-метод оценки повышения нормального уровня миоглобина в крови пациента 18

5.6. Экспресс-метод оценки содержания миоглобина
в биологических жидкостях пациента по дискриминационным уровням 19

5.7. Полуколичественная оценка содержания миоглобина в биологических жидкостях пациента 22

5.7.1. Процедура гемагглютинационного теста 22

5.7.2. Учет результатов анализа 22

5.8. Возможные ошибки при проведении анализа и способы их избежания 23

1.Введение

Необходимость диагностики острого инфаркта миокарда (ОИМ) в ранние сроки заболевания не вызывают сомнений, так как своевременно поставленный диагноз позволяет вовремя начать адекватную терапию и предупредить развитие целого ряда тяжелых осложнений. Несмотря на значительные достижения в диагностике ОИМ, по-прежнему встречаются затруднения при распознавании этого заболевания в первые часы болезни, когда общепринятые биохимические исследования и ряд других диагностических тестов еще не могут быть применены или оказываются малоинформативными; Эта проблема тесно связана и с решением вопроса об улучшении диагностики ОИМ на догоспитальном этапе, а также в условиях стационаров, не имеющих оборудования, необходимого для проведения сложных биохимических, ультразвуковых и ряда других исследований. В связи с этим продолжаются поиски новых и усовершенствование известных методов, позволяющих распознавать ОИМ в ранние сроки от начала заболевания.

Исследования последних лет показали высокий диагностический потенциал использования в этих целях миоглобинового теста. Закономерное увеличение содержания миоглобина (МГ) в крови больных ИМ и появление его в моче подтверждено с помощью высокочувствительных методов-радиоиммунологического анализа (РИА), иммуноферментного анализа (ИФА).

Однако, возможность широкого использования в практике отечественного здравоохранения (служба "скорой помощи", палаты интенсивной терапии, кардиологические отделения больниц, поликлиники и т.п.) диагностики ИМ с помощью определения МГ в биологических жидкостях появилась только с разработкой микро метода определения МГ в реакции пассивной гемагглютинации и промышленного выпуска тестов, основанных на принципах этой реакции.

2. Краткая характеристика миоглобина и его физиологических функций

Миоглобин - гемсодержащий белок с молекулярной массой 17300 дальтон, отличающийся от гемоглобина фракцией глобина. Получен в чистом виде из скелетных мышц и миокарда многих видов животных и человека. В гладких мышцах не обнаружен. Миоглобин состоит из полипептидной части (глобин) и простатической группы (гем). По данным рентгеноструктурного анализа он имеет сферическую глобулярную форму. Установлены состав белка (153 остатка аминокислот) и последовательность соединения аминокислот в молекулу (рис. 1).

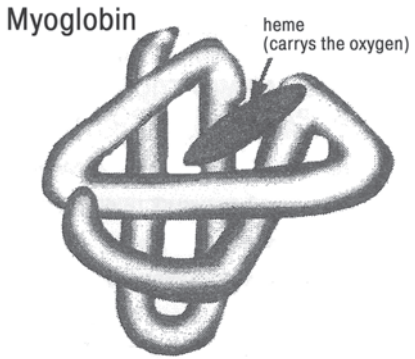


Рис. 1. Схема строения молекулы миоглобина.

Миоглобин является одним из ключевых соединений, определяющих высокую интенсивность окислительного метаболизма в скелетной мышце и, особенно, в миокарде. МГ обладает способностью обратимо связываться с кислородом. Основная его функция - транспорт кислорода от гемоглобина также поддержание оптимального кислородного градиента вблизи митохондрий. МГ выступает и как депо накопления кислорода в мышцах: депонирование происходит в период покоя, расход - в момент сокращения. Однако, "емкость" этого источника кислорода невелика - при ишемии миокарда адекватное снабжение миоцита кислородом осуществляется, лишь в течении 15-20 сек.

Миоглобин локализуется в различных участках миоцита. Благодаря мобильности МГ в миоците, отсутствию прочных связей с внутриклеточными структурами, а также небольшой молекулярной массе, он быстро выходит из мышечной клетки при ее повреждении и попадает в кровь, а затем выводится почками с мочой. Уровень миоглобина в крови практически здоровых людей не превышает 95 нг/мл. В норме почками выводится не более 4 мкг/сутки МГ (в среднем 2-4 нг/мл), поэтому методами анализа с чувствительностью менее 1 ж/мл МГ в моче здоровых лиц не определяется.

Классификация состояний, сопровождающихся гипермиоглобинемией и миоглобинурией, приведена в таблице 1.

3. Методы определения миоглобина. Отличительные особенности набора "ДС-ЭРИТРО-МИОГЛОБИН"

В последние годы в результате проведения ряда исследований накоплены данные о клинической значимости определения МГ в крови и моче. Однако, использование этого теста в учреждениях практического здравоохранения тормозится отсутствием простых и надежных методов определения МГ.

Чувствительный и специфический метод РИА миоглобина в сыворотке крови, несмотря на свои положительные качества, обладает общими для всех радиоиммунологических методов недостатками: необходимостью использования дорогостоящего оборудования и требованием радиационной безопасности. Поэтому РИА может быть применим только в крупных центрах, оснащенных необходимой аппаратурой и квалифицированным персоналом. Такая трудность РИА, как требование радиационной безопасности, преодолена различными вариантами ИФА, которые отличаются высокой чувствительностью, специфичностью, стабильностью реагентов, возможностью автоматизации исследований. Однако, как и РИА, метод ИФА достаточно трудоемок и может быть осуществлен лишь при наличии специального аппаратурного обеспечения. Ни РИА, ни ИФА не позволяют идентифицировать МГ в образцах мочи.

Существенный выигрыш во времени анализа дает простой полуколичественный тест, основанный на принципе агглютинации латекса, однако, чувствительность определения МГ с его помощью не превышает 100 нг/мл, в то

время, как РИА и ИФА имеют чувствительность выявления МГ 1 нг/мл.

В практике здравоохранения главными критериями ценности метода становятся (наряду с высокой чувствительностью и специфичностью) простота проведения анализа и учета его результатов, а также скорость получения требуемого результата. Этим требованиям в большей степени, нежели перечисленные методы, отвечает гемагглютинационный тест.

Эритроцитарный диагностикум для выявления миоглобина "ДС -ЭРИТРО - МИОГЛОБИН" выпускается НПО "Диагностические системы". Этот тест-набор может быть рекомендован для экспресс-анализа МГ в крови и в моче пациентов в качестве дополнительного теста диагностики ИМ в учреждениях здравоохранения, и в условиях "скорой медицинской помощи", т.к. он не требует специального оборудования.

Эритроцитарный диагностикам для выявления миоглобина представляет собой стабилизированные формальдегидом куриные эритроциты, покрытые антителами к человеческому МГ. В основу метода определения МГ данным тестом положена реакция обратной пассивной гемагглютинации. МГ в исследуемом образце связывается с антителами на эритроцитах и вызывает их агглютинацию. В отсутствие МГ или при его минимальном содержании эритроциты выпадают под действием гравитационных сил на дно и формируются там в виде компактной точки.

Определение МГ тест-набором "ДС-ЭРИТРО-МИОГЛОБИН" производится полуколичественным методом, однако, путем сравнения результатов, полученных данным методом и методом ИФА, показано, что они имеют равноценную информационную значимость.

"ДС-ЭРИТРО-МИОГЛОБИН" характеризуется следующими параметрами:

ОБЪЕКТ АНАЛИЗА	**- объем образца для анализа 50 мкл;** **- биологические жидкости: кровь (сыворотка, плазма, лизат*), моча**;**
ВРЕМЯ АНАЛИЗА	**- быстрый гемагглютинационный тест;** **- результат через 20 - 30 мин от начала анализа;**
ПРОСТОТА	**- готовый к употреблению однокомпонентный реагент;** **- удобная процедура анализа;**
ВЫСОКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ	**- специфический иммунохимический тест;** **- тест на миоглобин в присутствии гемоглобина и альбумина;**
ВЫСОКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ	**- чувствительность определения миоглобина различными партиями препарата от 0,5 до 0,4 нг/мл;**
СТАБИЛЬНОСТЬ ХРАНЕНИЯ	**- гарантийный срок хранения лиофилизированного препарата не менее 1 года при 4°С (в условиях бытового холодильника).**

* Высокая специфичность гемагглютинационного теста с помощью "ДС -ЭРИТРО - МИОГЛОБИН" позволяет существенно ускорить анализ путем отказа от получения сыворотки или плазмы крови. Для экспресс-анализа кровь берут у пациента из пальца в объеме 0,05 мл, как это делается при общем анализе крови, и переносят в дистиллированную воду. Практически мгновенно происходит лизис эритроцитов и других форменных элементов крови. Определение МГ в лизате крови осуществляют обычным для данного тест-набора приемом.

** В отличие от РИА и ИФА тест-набор "ДС-эритро-миоглобин" пригоден для определения МГ в моче. Образцы мочи пациентов не подлежат хранению, вследствие высокой скорости адсорбции МГ на стенках пробирок с пробами мочи. Поэтому, единственным требованием является необходимость анализа не позднее 5 мин от получения пробы мочи у пациента. В отличие от мочи, подготовленные к анализу образцы сыворотки, плазмы или лизата крови могут храниться до начала анализа при 4 *С (условия бытового холодильника) несколько часов; в случае длительного хранения образцы спедует заморозить при минус 20'С.

4. Миоглобин в крови и в моче при инфаркте миокарда

При развитии некроза миокарда, например, при ИМ, разрушаются мембраны миоцитов и содержимое клетки, в том числе и белки, поступает в кровоток. Так как МГ имеет молекулярную массу (17800 дальтон), меньшую, чем ферменты, обычно используемые как маркеры некроза миокарда -креатинин киназа (КФК - 80000 дальтон) или лактатдегидрогеназа (ЛДГ -130000 дальтон), он появляется в кровотоке раньше упомянутых ферментов. Этим определяется диагностическая значимость и ценность метода определения МГ при ИМ.

Контроль за уровнем МГ в крови позволяет диагностировать некроз миокарда раньше, чем другие известные сегодня биохимические методы, включая такие распространенные, как исследование активности КФК и ее МБ изофермента (рис. 2). Содержание МГ в крови оказывается повышенным уже через 1,5 часа после начала ангинозного приступа более чем в 70% случаев, а к 6 часам - у 100% больных крупноочаговым ИМ. Важная особенность динамики концентрации МГ в крови - быстрое ее увеличение (максимальный уровень отмечается к 7 - 10-му часу после начала ангинозного приступа с превышением верхнего продела нормы в 4 -10 и более раз) и последующая быстрая нормализация (к 28 - 36 ч заболевания при неосложненном течении ИМ). Это создает благоприятные предпосылки для диагностики повторного ИМ или распространения очага поражения (рис. 3)

В последнее время показано, что между содержанием МГ в крови и кумулятивной активностью КФК и ее изофермента МБ КФК имеется четкое соответствие. На основании исследования содержания МГ в крови можно составить представление о размере некроза миокарда. Были найдены высокодостоверные соотношения между

концентрацией МГ, прогнозом жизни больных и вероятностью развития "застойной" сердечной недостаточности. Так, например, если к 4-му часу заболевания уровень МГ в крови не превышает 500 нг/мл, то прогноз благоприятный, и более 90% больных преодолевают период кризиса. Концентрация МГ в крови к этому часу более 500 нг/мл свидетельствует о неблагоприятном прогнозе: летальность в этой группе больных почти 100%.

Малые размеры молекул МГ, в отличие от размеров молекул ферментов, используемых для диагностики ИМ, позволяют ему преодолевать почечный барьер. Поэтому, при ИМ миоглобинурия наблюдается также закономерно, как гипермиоглобинемия. Динамика содержания МГ в крови и в моче однотипна. Миоглобинурия отмечается уже в первые часы болезни (так к 8-му часу после ангинозного приступа МГ в моче обнаруживается у 80 - 90% больных крупноочаговым ИМ). Концентрация МГ в моче достигает максимальной величины к концу первых суток болезни и нормализуется через 3 суток от начала заболевания. Важное преимущество способа определения МГ в моче с целью диагностики ИМ - его методическая простота, которая позволяет получить ответ практически в любых условиях, в том числе и на ^догоспитальном этапе, в сельских амбулаториях и т.п.

Известно, что МГ миокарда иммунологически идентичен МГ скелетных мышц. Причины, которые могут вызвать гипермиоглобинемию и миоглобинурию, приведены в табл. 1. Подавляющее большинство из них трудностей для дифференциальной диагностики ИМ не представляют. Важно подчеркнуть, что в ситуациях, которые нередко имеют место у больных ИМ, и, следовательно, должны учитываться при оценке результатов миоглобинового теста, не было отмечено существенного изменения уровня МГ в крови. В частности, достоверного повышения уровня МГ не выявлено после однократной внутримышечной инъекции, пароксизмальных нарушений ритма сердца, на фоне выраженных признаков сердечной недостаточности без инфаркта миокарда, после дозированной физической нагрузки на велоэргометре, после приступа стенокардии, после инвазивных исследований (коронарной ангиографии и вентрикулографии).

Таким образом, диагностическая ценность определения МГ в крови и в моче состоит в том, что этот тест достаточно рано позволяет выявить ИМ. Кроме того, быстрая нормализация содержания МГ в крови позволяет в некоторых случаях уточнить диагностику распространения очага поражения или развития повторного ИМ. Определение концентрации МГ в крови позволяет составить суждение о величине очага поражения и уточнить прогноз заболевания. Несмотря на специфичность определения МГ, повышение его содержания в крови и в моче не является показателем исключительного миокардального повреждения. Тем не менее, диагностическая значимость определения МГ в биологических жидкостях при ИМ оценивается высоко.

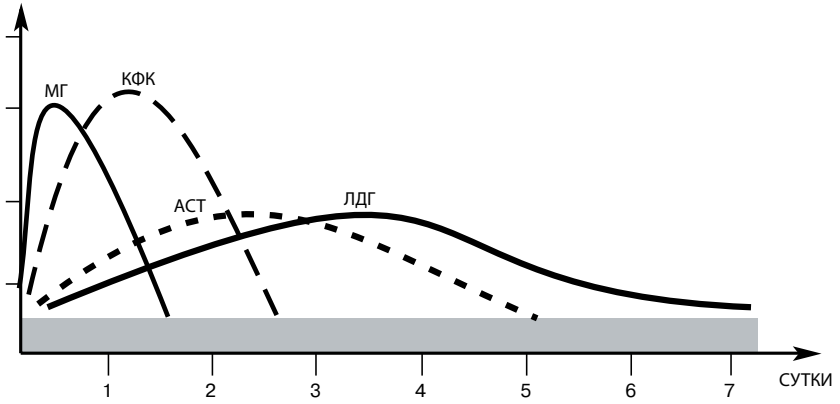


Рис. 2. Динамика уровня миогпобина и активности ферментов в сыворотке крови, в первые дни ИМ.

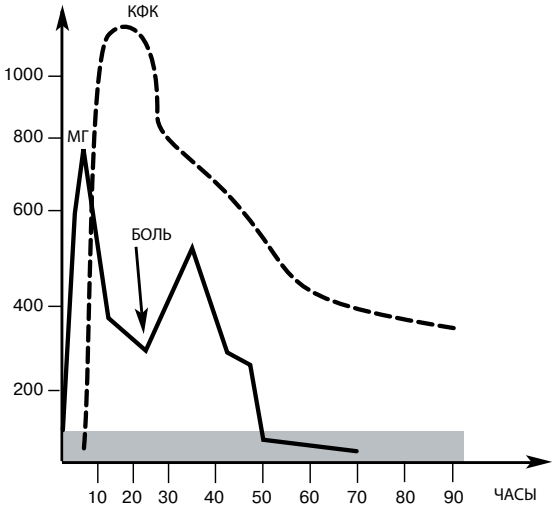


Рис. 3. Динамика уровня МГ и активности КФК у больного с распространением ИМ. Начиная со 2 по 50 час болезни содержание миогпобина в крови больного превышает верхнюю границу нормы.
Развитие ИМ передней стенки вызвало выраженную гипермиогпобинемию с максимальной степенью активности КФК к 8 часу заболевания.
Распространение очага некроза на боковую стенку, отмечено после ангинозного приступа (стрелкой отмечен момент возникновения боли) сопровождалось повторным повышением содержания миоглобина в крови.
Активность КФК в сыворотке крови приходит к норме к 106 часу заболевания (т.н."пролонгированный тип") кривой активности КФК.

Таблица 1.

Состояния, сопровождающиеся миоглобинемией и миоглобинурией

Причины развития гипермиоглобинемии и миоглобинурии	Краткое описание нарушений
1. Ишемия и раздавливание мышц	Сдавливание мышц вызывает ишемию, которая становится одним из механизмов повреждения. Рабдомилиоз возникает в случаях перевязки нижней полой вены, окклюзии артерий, при инфаркте миокарда, окклюзии сосудов в результате коагулопатии при серповидно-клеточной анемии и синдроме ДБС. Раздавливание, разможжение мышц в результате пребывания под завалами; сдавливание мышц весом собственного тела вследствие нахождения в коматозном состоянии или без сознании на твердой поверхности; оперативные вмешательства.
2. Тяжелые мышечные упражнения и неконтролируемая мышечная нагрузка	Рабдомиолиоз в результате спортивных упражнений, сопровождающихся повторяющимися ударами о твердый предмет: каратэ, бег. Необходимо учитывать: тяжесть 12физической нагрузки, вид упражнений (ряд упражнений вызывает ишемию). Миоглобинурия в результате неконтролируемой мышечной активности описана при белой горячке, астматическим статусе, психозе, при электротравме, эпилептическом тетанусе, длительном миоклонусе при вирусном энцефалите.
3. Воздействие окружающей температуры тела	Гипотермия. В ряде случаев низкая окружающая температура приводит к повреждению мышц и рабдомиолизу. Гипертермия. Отмечена Миоглобинурия при тепловом ударе, тепловых судорогах, ожогах.
4. Инфекции	Миоглобинурия при туляремии, болезни легионеров, септицемии; тетанусе, тифоидной лихорадке, при диарее на почве шигеллеза и сальмонеллеза, при инфекции вирусом коксаки и вирусом простого герпеса, инфлюэнце.
5. Денервационные поражения	Гипермиоглобинемия при нейрональных поражениях и невральной атрофии, при синдроме Гийена-Барре, при миастении, атрофии от бездействия или в результате функциональной денервации мышечных волокон.
6. Действие медикаментозных препаратов и ядов	Алкоголь. Может развиться рабдомиолиз при хроническом употреблении и при острых алкогольных миопатиях. Барбитураты, транквилизаторы, наркотики, окись углерода - непосредственное токсическое влияние на мышцу; корма, и как следствие, синдром раздавливания. Амфотерицин В, карбеноксолон, лакрица; слабительные, салуретики -гипокалиемия. Стрихнин, амфетамин, фенциклидин, аспирин, нитрофурантоин, тифозная вакцина, противостолбнячная вакцина, соли лития, ртути, парацетамол, локсапин, болиголов, амоксацин на фоне лихорадки и судорог отмечена миоглобинурия.
7. Метаболические нарушения. А. Патология митохондрий. Б. Синдром злокачественной гипертермии В. Другие патологические состояния.	 Дефект утилизации пирувата. Увеличение содержания лактата и пирувата в крови. Повышение концентрации цАМФ, аденилциклазы, ионов кальция в саркоплазматическом ретикулуме. Сильное выделение тепла без регенерации АТФ. Провоцирующие факторы: анестетики, стресс, инфекция, перегрев. Гипотериоз. Гипопаратиреоидизм. Гиперпаратиреоидизм. Развитие миопатий.
8. Патология мембран. А. Воспалительные заболевания мышц Б. Стероидная миопатия	 Отложения иммуноглобулинов в базальных мембранах. Полимиозит, дерматомиозит. Некроз и атрофия мышечных волокон. В результате лечения кортикостероидами развивается атрофия мышечных волокон, разрушаются миофибриллы.
9. Водно-электролитные нарушения	Гипокалиемия. Возникает в результате длительного приема салуретиков, слабительных, при хроническом алкоголизме, первичном альдостеронизме, энтеритах и колитах с рвотами и диарей, недостатке калия в диете, дегидратации. Развиваются некрозы мышечных волокон. Гипо- и гипернатриемия, гиперосмолярные состояния, например, в результате дегидратации, гиперосмолярной некетонемической кормы развиваются явления рабдомиолиза. Гипофосфатемия. Считается причиной некрозов мышечных волокон, например, в случае паратиреоидэктомии.

5. Практические приемы работ с тест-набором "ДС-ЭРИТРО-МИОГЛОБИН"

5.1. Общая характеристика диагностического тест-набора

"ДС-эритро-миоглобин" (диагностикум) выпускается в виде 2-х наборов: на 60 и 120 определений. В состав комплекта входят следующие компоненты: сенсибилизированные эритроциты (СЭ); лиофилизированные-1% формалинизированные куриные эритроциты, сенсибилизированные антителами против миоглобина; миоглобин-стандарт, лиофилизированные; планшет круглодонный, инструкция по применению.

Срок годности компонентов диагностикума в лиофилизированном состоянии 1 год при температуре хранения от 2 до 8^{0}С.

5.2. Визуальный контроль качества диагностикума

1. Эритроциты, сенсибилизированные антителами к миоглобину, должны представлять собой сухую, пористую массу, гигроскопичную, белого или светло-желтого цвета.

2. Регидратированные эритроциты должны представлять собой гомогенную суспензию коричневого цвета; миоглобин - прозрачный бесцветный раствор.

5.3. Материалы и оборудование, требуемое для хранения и использования диагностикума

Реактивы:

1. Вода дистиллированная.

2. Физиологический раствор (0,9% раствор хлорида натрия в дистиллированной воде).

Оборудование:

1. Холодильник для хранения диагностикума.

2. Дозаторы пипеточные с диапазоном 0,5 -1,0 мл и 25-50 мкл.

5.4. Контроль специфической активности диагностикума

Контроль специфической активности диагностикума производится при изготовлении препарата на Производстве. На этикетках коробок с диагностикумом указывается чувствительность определения миоглобина.

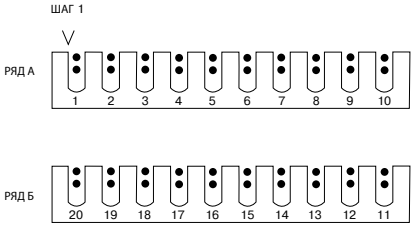
5.4.1. Процедура гемагглютинационного теста

Перед работой ампулы с сенсибилизированными эритроцитами и миоглобином вскрывают. В ампулу с эритроцитами вносят 2,5 мл физиологического раствора (конечная концентрация взвеси эритроцитов - от 0,8% до 1,2%). В ампулу с миоглобином вносят 1,0 мл физиологического раствора (концентрация миоглобина в растворе -10 мкг в 1,0 мл). Содержимое ампул тщательно перемешивают. Компоненты диагностикума должны растворится в течение от 2 до 5 мин.

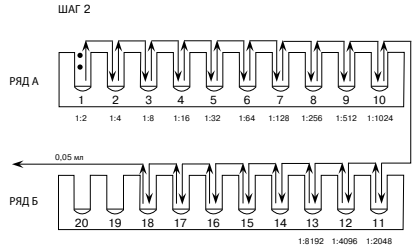
Регидратированный миоглобин хранят при температуре от 2 до 8^{0}С в течение месяца, суспензию эритроцитов - при температуре от 2 до 8^{0}С в течение 5 дней.

Присутствие гемоглобина, альбумина, иммуноглобулинов не оказывает влияния на определение миоглобина с помощью данного эритроцитарного диагностикума.

В случае необходимости проводится контроль чувствительности и специфической активности диагностикума в реакции пассивной гемагглютинации.

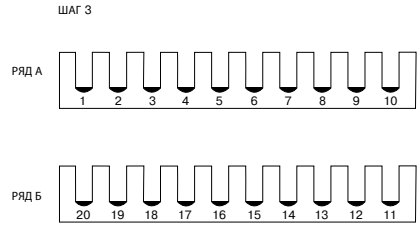


В 20 лунок планшета вносят по 50 мкл физиологического раствора.



В первую лунку вносят 50 мкл раствора стандарта миоглобина из ампулы, входящей в комплект диагностикума (концентрация МИОГПОБИНА -1610000 нг/мл) и проводят его титрование. Две последние лунки являются контрольными и раствора миоглобина не вносят.

Немедленно вносят во все лунки по 25 мкл суспензии эритроцитов, сенсибилизированных антителами против миоглобина.



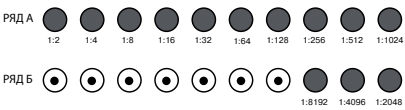
Содержимое лунок перемешивают осторожным постукиванием по краям планшета для равномерного распределения эритроцитов (не допускать расплескивания!). Оставляют планшет на листе белой бумаги на горизонтальной поверхности, предохраняя от вибрации и прямых солнечных лучей при комнатной температуре.

5.4.2. Учет результатов анализа

Учет результатов анализа проводят через 20-30 минут.

На схеме представлена картина характера осадка эритроцитов в лунках планшета. 8 последней лунке, где эритроциты еще агглютинированы (13 лунка), разведение стандартного раствора миоглобина (титр) - 1:8192. Поэтому чувствительность определения миоглобина равна:

10000 нг/мл: 8192 =1,2 нг/мл



Ряды А- Б: стандарт миоглобина; титр 1:8192 (13 лунка).

Под термином "чувствительность определения миоглобина" понимается то наименьшее количество белка, которое еще вызывает агглютинацию эритроцитов, покрытых антителами против миоглобина.

Диагностикум считается пригодным к использованию, если эритроциты агглютинированы в первых 11 - 14 лунках пластины с раститрованным стандартом миоглобина, а далее выпадают в виде компактной точки. Это соответствует чувствительности определения миоглобина от 0,5 до 5,0 нг/мл.

5.5 Экспресс-метод оценки повышения нормального уровня миоглобина в крови пациента

Представлен простейший вариант применения диагностического тест-набора, который рекомендуется для экспресс-диагностики ОИМ в первые часы развития заболевания на догоспитальном этапе, в приемном покое и т.п. Результатом анализа является информация о том, превышает ли содержание миоглобина в крови нормальный уровень.

Дозатором пипеточным вносят в пробирку:

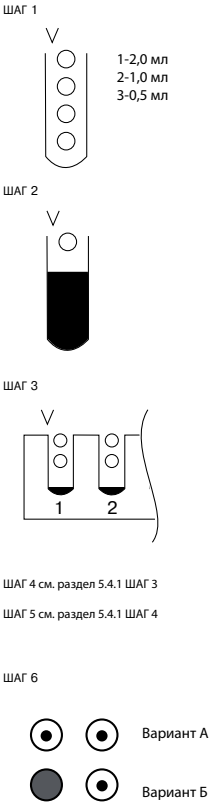
1 - при использовании диагностикума с чувствительностью определения МГ от 0,5 до 1,0 нг/мл - 2,0 мл дистиллированной воды;

2 - при использовании диагностикума с чувствительностью определения МГ 2,0 нг/мл - 1 ,0 мл дистиллированной воды;

3 - при использовании диагностикума с чувствительностью определения МГ 4,0 нг/мл - 0,5 мл дистиллированной воды. В пробирку вносят 50 мкп цельной крови, взятой меланжэром из пальца пациента. Тщательно перемешать (происходит лизис эритроцитов и других форменных элементов; раствор лизата должен быть прозрачным, ярко-красного цвета).

Дозатором переносят 50 мкл раствора из пробирки в лунку планшета. Во вторую лунку вносят 50 мкп физиологического раствора.

Учет результатов анализа проводят через 20-30 минут.



Выполнение компактного осадка эритроцитов в виде точки на дно лунки №2 свидетельствует об отсутствии самопроизвольной агглютинации эритроцитов и является контролем диагностического тест-набора.

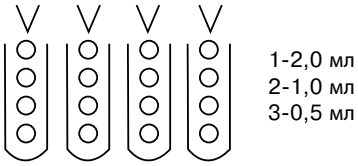
Выпадение компактного осадка эритроцитов в виде точки на дно лунки №1 (вариант А) указывает на нормальное содержание МГ в крови пациента.

Агглютинация эритроцитов в лунке №1 (вариант Б) указывает на повышенный уровень МГ в крови больного.

5.6. Экспресс-метод оценки содержания миоглобина в биологических жидкостях пациента по дискриминационным уровням

Данный вариант применения диагностического тест-набора дает информацию о диапазоне концентраций, в котором находится истинное значение концентрации миогпобина в биологической жидкости человека.

ШАГ 1

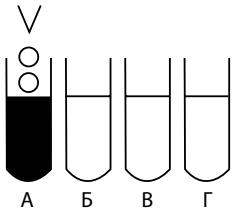


Дозатором пипеточным вносят:

1. при использовании диагностикума с чувствительностью определения миоглобина от 0,5 до 1,0 нг/мл - в пробирку А - 2,0 мл дистиллированной воды, в пробирки Б, В, и Г-по 2,0 мл физиологического раствора.

2. при использовании диагностикума с чувствительностью определения миоглобина 2,0 нг/мл - в пробирку А вносят 1,0 мл дистиллированной воды, а в пробирки Б, В и Г - по 1,0 мл физиологического раствора.

ШАГ 2



3. при использовании диагностикума с чувствительностью определения миоглобина 4,0 нг/мл - в пробирку А вносят 0,5 мл дистиллированной воды, а в пробирки Б, В и Г - по 0,5 мл физиологического раствора.

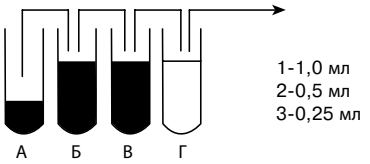
Приготовление образцов в разведении 1:80. В пробирку А вносят дозатором:

а) при анализе сыворотки или плазмы крови, мочи - 25 мкл испытуемой жидкости;

b) при анализе цельной крови - 50 мкл крови, взятой в меланжир из пальца пациента.

Тщательно перемешивают, (внесение цельной крови приводит к лизису эритроцитов и других форменных элементов крови; раствор лизата должен быть прозрачным ярко-красного цвета).

ШАГ 3



1:80 1:240 1:720

Приготовление разведений образцов 1:240 и 1:720.

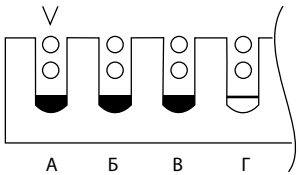
I. При использовании диагностикума с чувствительностью определения миоглобина 0,5 или 1,0 нг/мл - из пробирки А отбирают 1,0 мл и переносят в пробирку Б, перемешивают и переносят 1,0 мл в пробирку В, перемешивают и удаляют из нее 1,0 мл. Пробирка Г-контрольная.

II. при использовании диагностикума с чувствительностью определения миоглобина 2,0 нг/мл - из пробирки А отбирают 0,5 мл и переносят в пробирку Б, перемешивают и переносят 0,5 мл в пробирку В, перемешивают и удаляют из нее 0,5 мл. Пробирка Г - контрольная.

III. при использовании диагностикума с чувствительностью определения миоглобина 4,0 нг/мл - из пробирки А отбирают 0,25 мл и переносят в пробирку Б, перемешивают и переносят 0,25 мл в пробирку В, перемешивают и удаляют из нее 0,25 мл. Пробирка Г- контрольная.

Из каждой пробирки дозатором переносят в соответствующую лунку планшета по 50 мкл жидкости.

ШАГ 3

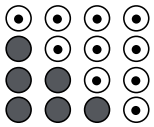
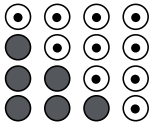
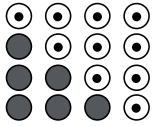
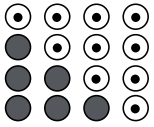


ШАГ 5 см. раздел 5.4.1 ШАГ 3

ШАГ 6 см. раздел 5.4.1 ШАГ 4

ШАГ 7. Учет результатов анализа проводят через 30 мин по характеру осадка эритроцитов. Оценку уровня миоглобина в испытуемом образце осуществляют по таблице 2.

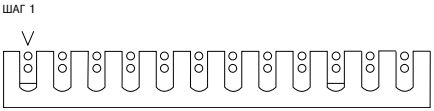
Таблица 2.

Чувствительность определения миоглобина диагностикумом, нг/мл	**Уровень миоглобина в испытуемом образце, нг/мл**	**Характер осадка эритроцитов в лунках**
		А Б В Г
0,5	**менее 40 от 40 до 80 от 80 до 240 выше 360**	
1,0	**менее 80 от 80 до 240 от 240 до 720 выше 720**	
2,0	**менее 80 от 80 до 240 от 240 до 720 выше 720**	
4,0	**выше 360**	

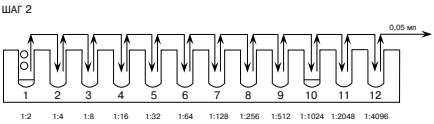
5.7. Полуколичественная оценка содержания миоглобина в биологических жидкостях пациента

Определение содержания миоглобина в биологических жидкостях человека в реакции пассивной гемаглютинации является полуколичественным методом. Рекомендуется и для научно-исследовательских целей.

5.7.1. Процедура гемагглютинационного теста



Дозатором вносят в лунки 1-12 по 50 мкл физиологического раствора.



В лунку 1 вносят 50 мкл испытуемого образца (сыворотка, плазма или лизат крови, моча). При анализе цельной крови предварительно проводят лизирование эритроцитов и других форменных элементов крови путем внесения 50 мкл цельной крови в 250 мкл дистиллированной воды.

Содержимое лунки тщательно перемешивают путем пилотирования, и перенести 50 мкл в лунку 2, перемешивают и переносят 50 мкл в лунку 3 и т.д. Продолжить двукратные разведения до лунки 11. Последняя лунка является контрольной, и испытуемый образец не вносят.

ШАГ 3 см. раздел 5.4.1 ШАГ 3

ШАГ 4 см. раздел 5.4.1 ШАГ 4

5.7.2. Учет результатов анализа

Ряд А: испытуемый образец; титр 512 (лунка 9)

Учет результатов анализа проводят через 30 мин. На схеме представлена в качестве примера картина осадка эритроцитов и их агглютинации в одном из исследуемых образцов. В последней лунке (9 лунка), где эритроциты еще агглютинированы, концентрация миоглобина равна чувствительности метода его определения. Поэтому содержание миоглобина в испытуемом образце определяют как произведение чувствительности его определения на титр:

1,2 нг/мл x 512 = 615 нг/мл

В случае, если образец испытуемой плазмы, сыворотки крови или мочи до анализа разведен в n-количестве раз, то для определения содержания миоглобина в исходном образце биологической жидкости полученный результат следует умножить на число n.

Расчет содержания миоглобина в лизате цельной крови производят с учетом предварительного разведения образца цельной крови при лизисе.

5.8. Возможные ошибки при проведении анализа и способы их избежания

Описание ошибки	Причина	Метод устранения
1 . Агглютинация эритроцитов в контрольной лунке	Спонтанная агглютинация эритроцитов в отсутствие миоглобина при использовании старого планшета, либо, в результате неправильного хранения или транспортировки диагностикума	1. Взять новый планшет. 2. В случае агглютинации эритроцитов в новом планшете ампула с сенсибилизированными эритроцитами не подлежит использованию.
2.Агглютинация эритроцитов во всех лунках за исключением контрольных, при количественном варианте определения миоглобина	Недостаточное разведение испытуемого образца	Развести испытуемый образец до анализа в 50 раз физиологическим раствором
3. Отдельные скопления эритроцитов на дне лунки на фоне их агглютинации	Дефекты поверхности лунки (царапины, трещины и т.д.)	Взять новый планшет
4. Появление осадка эритроцитов в виде компактной точки в первых нескольких лунках и качественная агглютинация эритроцитов в последних лунках при постановке количественного варианта определения миоглобина.	Эффект прозоны в реакции пассивной агглютинации	Данный эффект не искажает результатов анализа

Нижний Новгород

Главный офис:
ООО «НПО «Диагностические системы»
603093, г. Нижний Новгород,
ул. Яблоневая, д. 22
тел. (831) 434-86-83

Отдел сбыта:
ул. Нижне-Волжская набережная, д. 9
тел. (831) 461-92-02
тел/факс (831) 461-92-15, 461-92-16, 461-92-17
info@npods.nnov.ru
selling@npods.ru
http://www.npods.ru

Региональные предприятия

Москва	ООО "Диагностические системы—Столица" 117405, г. Москва, ул. Дорожная, д. 60 Б тел. (495) 411-96-84, 411-96-85, 411-96-86 e-mail: ds-stolica@bk.ru zav2006@bk.ru
Санкт-Петербург	ООО "Диагностические системы—СПб" 194044, г. Санкт-Петербург, пр. Большой Сампсониевский, д. 66, Литер А тел/ факс (812) 702-17-13, 702-17-14 spb@npods.ru managerspb@npods.ru
Красноярск	ООО "Диагностические системы—Сибирь" 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 16 д тел/ факс (3912) 54-16-55, 54-14-66, 54-17-58 ds-siberia@scn.ru
Республика Украина	ООО "Диагностические системы—Украина" 04210, г. Киев, а/я 119 тел. (10-380-44) 501-90-80, тел/факс 501-91-00 ua@npods.ru
Республика Казахстан	ТОО "Диагностические системы—Казахстан" 050034, г. Алматы, ул. Бродского, д. 37 а, офис 227 тел./факс (3272) 27-37-68, 27-37-69 ds-kazakstan@mail.kz
Республика Узбекистан	ООО "Диагностические системы—Бактрия" 100015 г. Ташкент, ул. Ойбек, д. 32 тел./факс (998 71) 152-23-15, 152-23-16 тел.: (998 98) 127-15-87, (998 93) 181-75-21, (998 97) 157-20-77 ds-baktriya@mail.ru
Ростов-на-Дону	Обособленное подразделение 344068, г. Ростов-на-Дону пр. М.Нагибина, д. 33 а/47, 3 этаж, офис 5 тел/факс (863) 292-41-01, моб. 8-8632-75-66-22 RostovDon@npods.ru
Чита	Обособленное подразделение 672000, г. Чита, ул. 9 января, д. 6, офис 103 тел. (3022) 35-27-91, chitanpods@mail.ru