

INTENCIÓN DE USO

El kit Mioglobina ELISA se utiliza para la determinación cuantitativa de Mioglobina en suero humano.

RESUMEN

La Mioglobina es una hemoproteína con un peso molecular aproximado de 17.500 Daltons y se encuentra presente en el músculo cardíaco y esquelético. Los daños ocasionados a ambos tipos de músculo en condiciones de trauma, isquemia y otras enfermedades que causan miopatía, se asocian con la liberación de Mioglobina en suero. En concreto, a continuación de la necrosis cardíaca asociada con el infarto de miocardio (IM), la Mioglobina es uno de los primeros marcadores en elevarse por encima de los niveles normales. Los niveles de Mioglobina aumentan sensiblemente dentro de las 2 a 4 horas post-infarto, alcanzando un máximo dentro de las 09-12 horas, y volviendo a los niveles normales dentro de 24 a 36 horas. En ausencia de trauma en el músculo esquelético o de otros factores asociados con un aumento de la Mioglobina no cardíaca en circulación, sus niveles se han utilizado como un marcador temprano de infarto de miocardio. Varios informes sugieren que la medición de la Mioglobina como ayuda diagnóstica para infarto de miocardio, cuenta con valores predictivos negativos de hasta el 100% después de la aparición de síntomas. A diferencia de otras enzimas cardíacas tales como CK y CK/MB, que no alcanzan niveles séricos hasta varias horas post-infarto (aprox. 19 horas), los niveles de Mioglobina alcanzan su pico entre las 6 y 9 horas. El inmunoensayo enzimático de Mioglobina es un método rápido, sensible, y fiable para la medición cuantitativa de la Mioglobina en suero.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El kit Mioglobina es un método ELISA sándwich en fase sólida directa. El ensayo utiliza un anticuerpo monoclonal único direccionado contra un antígeno distintivo y determinante en la molécula. El anticuerpo monoclonal de ratón anti-Mioglobina se utiliza para la fase sólida de inmovilización en los micropozos. Un anticuerpo de cabra se encuentra presente en el conjugado enzimático. Se le permite a la muestra reaccionar simultáneamente con los dos anticuerpos, resultando en un sándwich de las moléculas de Mioglobina entre los anticuerpos de fase sólida y aquellos ligados enzimáticamente. Luego de una incubación de 45 minutos a temperatura ambiente, los micropozos son lavados a fin de eliminar los anticuerpos no unidos. Se agrega el sustrato TMB y se incuba por 20 minutos, resultando en una coloración azul, la cual es frenada por la solución de lavado, propiciando una coloración amarilla. La concentración de Mioglobina es directamente proporcional a la intensidad de color. La absorbancia debe ser leída a 450 nm.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Micropozos recubiertos con Anti-Mioglobina de ratón	12x8x1
2. Estándares de Referencia	0.5 ml
3. Diluyente de la muestra	25 ml
4. Conjugado Enzimático	22 ml
5. Sustrato TMB: 1 frasco (listo para su uso)	11 ml
6. Solución de Frenado 1 frasco (listo para su uso)	11 ml
7. Solución de Lavado Concentrado 20X: 1 frasco	25 ml

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector Microelisas con lente a 450 nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadriculado.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a 2 - 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre que las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas como se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Potencial de los materiales de riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales. "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984.
2. No pipetee con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo.
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Es recomendable que los estándares, controles y muestras de suero se corran por duplicado
5. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este pueden dar datos no válidos.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Todas las muestras y reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-23°C) previo a su uso.
2. Las muestras y controles deben ser diluidos con un factor 10 antes del ensayo. Preparar una serie de tubos de ensayo (por ej. de 1.5 ml) y mezclar 20 µl de suero con 180 µl (0.18 ml) de diluyente de la muestra. **NO DILUIR LOS ESTANDARES QUE YA HAN SIDO DILUIDOS CON UN FACTOR 10.**
3. Las muestras con concentraciones esperadas de Mioglobina de más de 1000 ng/ml pueden ser cuantificadas para ser posteriormente diluidas con un factor 10.
4. Preparar una solución de lavado a 1X, adicionando el contenido de la botella (25 ml, 20 X) a 475 ml de agua destilada o des ionizada. Conservar a temperatura ambiente (18-23°C).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Previo al ensayo, todas las muestras y reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-26°C). Mezcle gentilmente todos los reactivos previos a su uso.

1. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los pozos no utilizados y refrígerarlos a 2-8°C.
2. Dispense 20 µl de estándares, muestras y controles en los micropozos designados.
3. Dispense 200 µl de Conjugado Enzimático en cada pozo.
4. Mezcle por 30 segundos. Es importante que el mezclado se lleve a cabo completamente.
5. Incube a temperatura ambiente (18-23°C) por 45 minutos.
6. Remueva el líquido de los pozos en un depósito de residuos.
7. Lave en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado a 1x. Golpear los pozos sobre una toalla o papel absorbente hasta remover todos los residuos líquidos.
8. Agregue 100 µl de sustrato TMB en cada pozo. Mezclar gentilmente por 5 segundos.
9. Incube a temperatura ambiente (18-23°C) por 20 minutos.
10. Frene la reacción agregando 100 µl de Solución de Frenado a cada pozo. Mezclar gentilmente.
11. Mezcle gentilmente por 30 segundos. Es importante que la coloración azul cambie a amarillo completamente.
12. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Calcular el valor de absorbancia media para cada estándar de referencia, controles y muestras.
2. Para la construcción de la curva trazar la lectura de absorbancia media para cada estándar de referencia en eje vertical contra su concentración en ng/ml en eje horizontal en papel grafico lineal, dibujar la curva de mejor manera posible uniendo los puntos.
3. Utilizar el valor de absorbancia media para cada espécimen a fin de determinar la correspondiente concentración de Mioglobina desde la curva estándar. Registrar el valor de cada control o muestra desconocida.

EJEMPLO DE CURVA STANDARD

Los resultados de un ensayo estándar con lecturas de absorbancia a 450 nm se indican en el eje Y mientras que las concentraciones de Mioglobina se muestran en el eje X. El propósito de la curva estándar es meramente ilustrativo y no debe ser utilizado para el cálculo de muestras desconocidas. Cada laboratorio debe obtener sus propios datos y construir su propia curva estándar.

Concentración (ng/ml)	O.D. 450 nm
0	0.045
25	0.191
100	0.628
250	1.445
500	2.178
1000	2.896

PERFORMANCE

Coefficiente de correlación	0.9392
Pendiente	0.9948
Interpretación	55, 051
Media	287.9 ng/ml
Media Abbott	262.5 ng/ml

1. **Sensibilidad.** La concentración mínima detectable del ensayo de Mioglobina ELISA medida por 2SD de la media de un cero estándar se estima en **5 ng / ml**.
2. **Precisión.**
La precisión **Intra ensayo** se logra al medir cinco muestras de control en un solo ensayo con 20 réplicas:

Muestras de Suero	1	2	3	4	5
# Replicas	20	20	20	20	20
Media Mioglobina (ng/ml)	55.6	214.3	294.9	505.9	1.437
S.D.	2.2	12.9	16.2	26.3	94.0
C.V. (%)	3.9%	6.0%	5.5%	5.2%	6.6%

3. La precisión inter ensayo se calcula al medir cinco muestras de control por duplicado en una serie de ensayos individuales calibrados. Debajo se muestra la variabilidad inter ensayo:

Muestras de Suero	1	2	3	4	5
# Replicas	35	35	35	35	35
Media Mioglobina (ng/ml)	59.2	244.4	330.5	568.3	1451.7
S.D.	4.6	12.8	38.9	52.7	104.7
C.V. (%)	7.8 %	5.2 %	11.8 %	9.3 %	7.2 %

4. **Recupero:**
Varias muestras de pacientes con niveles de Mioglobina conocidos fueron combinadas y ensayadas por duplicado. La media de Recupero fue de 102.8%.

Par No.	Esperado Mioglobina (ng/ml)	Observado [Mioglobina] (ng/ml)	% Recupero
1	280	250	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%

REFERENCIAS

1. Kagen, L.J.: Myoglobin: Methods and Diagnostic Uses, CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 2:273; (1978).
2. Juronen, E.L., Viikmaa, M.H., and Mikelsarr, A.V.N.: Rapid, simple and sensitive antigen capture ELISA for the quantitation of myoglobin using monoclonal antibodies, J. Imm. Meth. 111, 109; (1988).
3. Chappelle JP. Et al.: Serum myoglobin determinations in the assessment of acute myocardial infarction. Eur. Heart Journal, 3:122, (1982).
4. Cairns, J.P., et.al. Usefulness of serial determinations of myoglobin and creatine kinase in serum compared for assessment of acute myocardial infarction, Clin. Chem. News, 29: 469, (1983).
5. Silva, D.P., et.al. Development and application of antibodies to human cardiac myoglobin in rapid fluorescence immunoassay, Clin. Chem., 37: 1356, (1991).
6. Ellis AK.: Patters of myoglobin release after reperfusion of injured myocardium. Clin. Chem., 72:639, (1985).
7. Mair J. et al.: Rapid diagnosis of myocardial infarction by immunoturbidimetric myoglobin measurement (letter). Lancet, 337:1343, (1991).
8. Chappelle, J.P.: Myoglobin. Clin. Chem. News, 17:22, (1991).
9. Hamfelt, A., ET. al.: Use of biochemical tests for myocardial infarction in the county of Vasternorrland, a clinical chemistry routine for the diagnosis of myocardial infarction. Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl., 200:20, (1990).
10. Tucker, J.F., et.al. Early diagnostic efficiency of cardiac troponin I and Troponin T for acute myocardial infarction, Academic Emergency Medicine: 4(1): 13-21; (1997).
11. De Winter, R.J., et.al. Value of myoglobin, troponin T and CK-Mbms in ruling out an acute myocardial infarction in the emergency room, Circulation: 92(12): 3401-7; (1995).
12. Montague, C., Kircher, T.: Myoglobin in early evaluation of acute chest pain, Amer. J. Clin. Path.: 104(4): 472-6; (1995).
13. Tucker, J.F., et.al., Value of serial myoglobin levels in the early diagnosis of patients admitted for acute myocardial infarction, Annals of Emergency Medicine: 24(4): 704-8; (1994).