

Bio-Troponina I

Inmunoensayo enzimático para la detección cuantitativa de Troponina I en suero.

INTENCIÓN DE USO

El kit Troponina ELISA se utiliza para la determinación cuantitativa de la Troponina I Cardíaca en suero. La medición de los valores de Troponina I resulta de ayuda en la evaluación de infarto de miocardio agudo (IAM).

RESUMEN

La Troponina es una proteína globular inhibidora o contráctil en la regulación del músculo estriado. Se encuentra periódicamente a lo largo del filamento fino del músculo y se compone de tres proteínas distintas: Troponina I, Troponina C y Troponina T. Asimismo, existe la subunidad Troponina I en tres isoformas separadas; dos en las fibras musculares esqueléticas de contracción rápida y de contracción lenta, y una en el músculo cardíaco. La isoforma cardíaca (cTnI) con aproximadamente 40% disímiles, tiene un peso molecular de 22.500 Daltons, y ha sido de gran utilidad en el diagnóstico diferencial de los pacientes que acuden a los servicios de urgencias con dolor en el pecho. El infarto de miocardio se diagnostica cuando los niveles sanguíneos de biomarcadores sensibles y específicos, tales como la Troponina Cardíaca, la Isoenzima MB de la creatina quinasa (CK-MB), y la Mioglobina, se incrementan en un entorno clínico de isquemia aguda. El biomarcador mayormente descrito y preferido para evaluar el daño miocárdico es la Troponina Cardíaca (I o T). Las Troponinas cardíacas exhiben especificidad de tejido del miocardio y alta sensibilidad. El nivel de cTnI persiste elevado durante un período de tiempo prolongado (6-10 días), proporcionando así una ventana más larga de la detección de la lesión cardíaca. Los niveles normales de cTn I en la sangre son muy bajos. Después de la aparición de un IAM, los niveles de cTnI aumentan sustancialmente y se pueden medir en el suero dentro de 4 a 6 horas, con concentraciones máximas alcanzadas en aproximadamente 12 a 24 horas después del infarto. El inmunoensayo enzimático de cTnI proporciona un método rápido, sensible y fiable para la medición cuantitativa de Troponina I Cardíaca específica. Los anticuerpos desarrollados para la prueba determinarán una concentración mínima de 1,0 ng / ml, sin reactividad cruzada con Troponina cardíaca o esquelética T o I.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El kit Troponina I es un método ELISA sándwich en fase sólida directa. El ensayo utiliza cuatro anticuerpos monoclonales únicos direccionados contra antígenos determinantes en la molécula. Tres anticuerpos monoclonales de ratón anti-TnI se utilizan para la fase sólida de inmovilización en los micropozos. El cuarto anticuerpo se encuentra presente en el conjugado enzimático. Se le permite a la muestra reaccionar simultáneamente con los cuatro anticuerpos, resultando en un sándwich de las moléculas de Troponina I entre los anticuerpos de fase sólida y aquellos ligados enzimáticamente. Luego de una incubación de 90 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 Troponina I 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-TnI de ratón	12x8x1
2. Estándares de Referencia: 6 viales (liofilizados)	1 ml
3. Conjugado Enzimático cTnI: 1 frasco (listo para su uso)	12 ml
4. Sustrato TMB: 1 frasco (listo para su uso)	12 ml
5. Solución de Frenado: 1 frasco (listo para su uso)	12 ml
6. 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 apearse 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.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Para el procedimiento del presente ensayo se requieren muestras de suero.
2. Recolectar la sangre por venopunción y separar el suero de inmediato.
3. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigerar la muestra a (2-8°C) por 24 horas. En caso de exceder dicho plazo, congelar a -20° C hasta un seis meses.
4. Evitar utilizar muestras con excesos de lípidos, hemolíticos o turbios (post centrifugación).
5. Evitar múltiples ciclos de congelación - descongelación. No almacenar en congeladores "frost free", que pueden causar descongelación ocasional. Las muestras que han sido congeladas, y las que son turbias y / o contienen partículas, deben ser centrifugadas antes de su uso.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Todas las muestras y reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-23°C) previo a su uso.
2. Reconstituir cada estándar liofilizado con 1.0 ml de agua destilada. Dejar asentar el material reconstituido por 20 minutos para luego mezclar gentilmente. Los estándares reconstituidos permanecerán estables por 8 horas mientras se encuentren sellados y almacenados a 2-8°C. Descartar los estándares reconstituidos pasadas las 8 horas. Para asegurar su máxima estabilidad, los estándares reconstituidos deben ser congelados a -20°C. Cada estándar deberá ser congelado y descongelado solo una vez.
3. 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

1. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los pozos no utilizados y refrigíralos a 2-8°C.
2. Dispense 50 µl de estándares, muestras y controles en los micropozos designados.
3. Agregue 100 µl de Conjugado Enzimático en cada pozo.
4. Mezcle por 30 segundos.
5. Incube a temperatura ambiente (20-25°C) por 60 minutos.
6. Remover 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 (20-25°C) por 15 minutos.
10. Frene la reacción agregando 50 µl de Solución de Frenado a cada pozo. Mezclar gentilmente.
11. 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 gráfico 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 Troponina I desde la curva estándar. Registrar el valor de cada control o muestra desconocida.
4. Muestras de pacientes con concentraciones de cTnI mayores que 100 ng/ml deberán ser diluidas en un factor de 10 con diluyente de muestra. Los resultados finales se observan en ng/ml.

EJEMPLO DE CURVA STANDARD

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.

cTnI (ng/ml)	Absorbancia (450nm)
0	0.006
1	0.055
3	0.215
6	0.520
18	1.361
36	2.176

VALORES ESPERADOS

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores tomando muestras de una porción representativa de la población local. Los siguientes valores pueden ser utilizados como referencia únicamente. Fueron analizados 225 adultos aparentemente sanos y se determinó que el rango normal es 0.5 ng/ml cTnI. El rango normal es menos que 100ng/ml. Todos los valores obtenidos se encontraban por debajo del nivel de sensibilidad del ensayo (1,0 ng/ml).

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Los resultados obtenidos por medio presente test solo deben ser utilizados como ayuda en el diagnóstico y deben ser interpretados en relación a la historia clínica del paciente, pruebas físicas y otros procesos de diagnóstico.
2. Las muestras pueden contener anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) que son capaces de dar resultados falsamente elevados o bajos en aquellos ensayos que utilizan anticuerpos monoclonales de ratón. El presente kit ha sido diseñado para minimizar la interferencia de muestras que contienen HAMA; sin embargo, la eliminación completa de esta interferencia en todas las muestras no puede garantizarse.

PERFORMANCE

- 1- **Sensibilidad.** La concentración mínima detectable del ensayo de cTnI ELISA medida por 2SD de la media de un cero estándar se estima en 1,0 ng/ml. Además, la sensibilidad funcional se determinó en 0,75 ng/ml (tal como se determina con Inter ensayo% CV <10%) Límite inferior de cTnI ELISA \pm 0.48 ng / ml cTnI; Límite superior=1.0 ng/ml cTnI.

- 2- **Efecto Gancho.** No fue observado en concentraciones de Troponina I de hasta 10,000 ng/ml.

- 3- **Precisión.**
La precisión Intra ensayo se logra al medir siete muestras de control en un solo ensayo con 20 réplicas:

Intra Ensayo

Muestras de Suero	1	2	3	4	5
# Replicas	20	20	20	20	20
Media cTnI (ng/ml)	1.69	5.93	24.3	44.9	89.8
S.D.	0.05	0.22	1.35	1.78	2.52
C.V. (%)	2.8	3.7	5.6	4.0	2.8

Inter Ensayo

Muestras de Suero	1	2	3	4	5
# Replicas	20	26	26	26	26
Media cTnI (ng/ml)	1.68	5.88	24.56	48.91	85.81
S.D.	0.11	0.28	1.14	2.23	3.76
C.V. (%)	6.7	4.8	4.7	4.6	4.4

4. **Especificidad:** Los siguientes marcadores fueron analizados para determinar reactividad cruzada en las concentraciones que se describen. No se observó reactividad cruzada para ninguno de los componentes:

MATERIAL ANALIZADO	CONCENTRACIÓN DE LA PRUEBA
Troponina C Esquelética Muscular	2,500 ng/ml
Troponina T Cardíaca Humana	2,500 ng/ml
Troponina T Esquelética Muscular	2,500 ng/ml
Troponina I Esquelética Muscular	2,500 ng/ml
Hemoglobina	1.2 g/dl
Bilirrubina	20 mg/dl
Colesterol	500 mg/dl
Triglicéridos	1,000 mg/dl
Proteína Total	10/dl

5. **Recupero:** Varias muestras de pacientes les fueron agregadas diferentes cantidades de cTnI (Mezcla de 1 vol. + 1vol.) y luego analizadas. La recuperación media fue de 93.3%. Los resultados se muestran en ng/ml:

Par No.	Esperado [cTnI] (ng/ml)	Observado [cTnI] (ng/ml)	% Recupero
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%