

Presage® ST2 Assay
Иммуноферментный набор для количественного
определения ST2

Кат. № BC-1065E – 96 определений
Версия: 201006 rev2

Замечание от ЗАО «БиоХимМак»

Уважаемые коллеги! Русская версия инструкции переведена с английского варианта. Обратите внимание на соответствие номера и даты версии английской инструкции, вложенной в набор, с русским переводом. Если версии на русском и английском языках не совпадают, обратитесь в ЗАО «БиоХимМак» за исправленным русским вариантом или используйте инструкцию на английском языке.

НАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноферментный анализ для количественного определения ST2 в человеческой сыворотке и плазме крови в условиях *in vitro*. Может быть использован в качестве вспомогательного теста для стратификации риска у пациентов с сердечной недостаточностью (СН) или острым коронарным синдромом (ОКС).

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания являются ведущей причиной смертности в общей популяции нашей планеты. Ежегодно от них погибает примерно несколько миллионов пациентов. Например, в Соединенных Штатах смертность от сердечно-сосудистых заболеваний составляет около 40 процентов от общей смертности, больше, чем от всех злокачественных новообразований. У многих пациентов, получающих лечение в связи с ишемической болезнью сердца (ИБС) и/или развитием острого коронарного синдрома, в конечном итоге формируется сердечная недостаточность. Сердечная недостаточность является хроническим прогрессирующим заболеванием, при котором вследствие снижения насосной функции миокарда функциональная способность сердца обеспечивать организм необходимым количеством крови и поддерживать метаболические потребности, существенно снижена. Распространенность сердечной недостаточности увеличивается во всех странах мира, лечение таких пациентов является основной статьёй расходов на пациентов, находящихся в стационаре (1). Среди основных причин больших расходов на лечение пациентов, страдающих тяжелой сердечной недостаточностью, отмечают высокую частоту госпитализации и смертности, а также необходимость оказания высокотехнологичной медицинской помощи. К сожалению, существующие методы оценки стратификации риска и прогноза у пациентов с ОКС и сердечной недостаточностью по-прежнему малоинформативны. Одним из вариантов, который можно применять в клинической практике, является определение содержания биомаркеров.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод Critical Diagnostics Presage® ST2 является количественным ИФА методом (т.н. сэндвич метод) для измерения концентрации ST2 в сыворотке или плазме крови. Анализ проводится в 96-луночных микропланшетах, дно лунок которых покрыто моноклональными антителами. Разбавленные образцы плазмы или сыворотки крови вносят в соответствующие лунки микропланшета и инкубируют в течение необходимого времени. После этапов промывки реагенты удаляются из лунок микропланшета, а также вносятся дополнительные реагенты, которые впоследствии вымываются. Анализ обнаруживается при добавлении колориметрического реагента, результирующий сигнал измеряется спектрофотометрически при 450 нм.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ:

1. Микропланшет, 96 лунок, дно лунок покрыто антителами к ST2
2. Лиофилизированный sST2 калибратор, 400 нг во флаконе (2 флакона)
3. Разбавитель для ST2 стандарта (13 мл во флаконе, 1 флакон)
4. Разбавитель для ST2 образцов (30 мл во флаконе, 2 флакона)
5. Реагент биотинилированных антител к ST2 (13 мл во флаконе, 1 флакон)
6. Концентрат 100X конъюгата стрептавидин пероксидаза хрена (HRP) (0.2 мл во флаконе, 1 флакон)
7. Разбавитель конъюгата стрептавидин - HRP (13 мл во флаконе, 1 флакон)
8. Концентрат промывающего буфера 20X (50 мл во флаконе, 1 флакон)
9. TMB Реагент (11 мл во флаконе, 1 флакон)
10. Стоп раствор (11 мл во флаконе, 1 флакон)

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ:

1. Калиброванные пипетки: одноканальные пипетки на 100 мкл и 1,0 мл, многоканальные пипетки на 300 мкл
2. Одноразовые наконечники
3. Микропланшетный шейкер (с возможностью встряхивания со скоростью 750 об./мин)
4. Микропланшетный ридер, способный измерять оптическую плотность при 450 нм.
5. Круглодонный 96-луночный микропланшет из пластика с низкой сорбционной способностью для предварительного разведения.
6. Набор контролей (лиофилизированный рекомбинантный ST2 человека) – поставляется отдельно компанией Critical Diagnostics (кат.номер BC-1066E).

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ:

1. После получения храните невскрытый набор в холодильнике (2-8°C). Компоненты набора стабильны в течение всего срока годности, указанного на этикетке набора.
2. Для минимизации воздействия влажного воздуха держите микропланшет в запечатанном пакете с осушителем.
3. Микропланшет состоит из двенадцати (12) стрипов по восемь (8) лунок. Отберите из холодильника необходимое для проведения анализа количество стрипов.
4. До проведения анализа отберите необходимо количество реагентов. Все остальные реагенты необходимо вернуть для хранения в холодильник.
5. Разведенные калибраторы могут храниться в течение не более 7 (семи) дней, если хранятся между использованиями охлажденными.

УСЛОВИЯ ЗАБОРА И ХРАНЕНИЯ ОБРАЗЦА:

Для теста Presage® ST2 могут быть использованы образцы сыворотки человека, плазмы с ЭДТА и плазмы с гепарином только. Для теста Presage® ST2 непригодна плазма с цитратом. Процедура забора крови для анализа стандартная.

Центрифугирование и отделение сыворотки или плазмы от форменных элементов крови должно быть произведено как можно скорее с момента забора крови.

Рекомендуемый объем образца для выполнения анализа Presage® ST2 составляет 20 мкл, этого достаточно для постановки в дубле, следующей за рекомендуемым разведением образца. При необходимости сыворотка или плазма могут быть сохранены для проведения анализа в будущем. Анализ эндогенного ST2 человека показал, что ST2 остается стабильным при соблюдении следующих условий:

Хранение и стабильность образца:

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ (ТЕМПЕРАТУРА)	СТАБИЛЬНОСТЬ ОБРАЗЦА
20°C	48 часов
4°C	7 дней
-20°C и -80°C	18 месяцев

Концентрация ST2 в плазме с ЭДТА не подвержена значительным изменениям при замораживании/размораживании образца, и была показана его стабильность при 15-кратных замораживании/размораживании одного и того же образца.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Компоненты этого набора, непосредственно контактирующие с человеческой плазмой или сывороткой должны быть обработаны как биологически опасные отходы и утилизированы в соответствии с локальными правилами.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ:

1. Перед использованием дайте реагентам нагреться до комнатной температуры (18 - 25 °C), по крайней мере, за один (1) час перед проведением анализа!
2. Разведите лиофилизированный стандарт в объеме деионизированной воды, указанном на этикетке флакона, концентрация в рабочем стандарте составляет 400 нг/мл. Оставьте разведенный стандарт на 30 минут, время от времени перемешивайте его. Выполните серийное двукратное разведение концентрата стандарта следующим образом:
 - a. 200 нг / мл: 0,4 мл 400 нг / мл сток-раствора + 0,4 мл разбавителя для стандартов
 - b. 100 нг / мл: 0,4 мл 200 нг / мл + 0,4 мл разбавителя для стандартов
 - c. 50 нг / мл: 0,4 мл 100 нг / мл + 0,4 мл разбавителя для стандартов
 - d. 25 нг / мл: 0,4 мл 50 нг / мл + 0,4 мл разбавителя для стандартов
 - e. 12,5 нг / мл: 0,4 мл 25 нг / мл + 0,4 мл разбавителя для стандартов
 - f. 6,25 нг / мл : 0,4 мл 12,5 нг / мл + 0,4 мл разбавителя для стандартов
 - g. 3,125 нг / мл : 0,4 мл 6,25 нг / мл + 0,4 мл разбавителя для стандартов
 - h. 0,0 нг / мл бланк: 0,4 мл разбавителя для стандартов
3. Разведите образцы пациентов (гепаринизированную или ЭДТА плазму, сыворотку крови) в 50 раз, используя реагент для разведения образцов, входящий в состав набора, по следующей схеме (см. схему ниже):
 - a. Этап 1: Подготовьте 96-луночный микропланшет с круглым дном, внесите по 0,180 мл разбавителя для образцов в ряды с 1 по 5 и 0,200 мл разбавителя для образцов в рядах с 6-10.
 - b. Этап 2: Внесите по 0,020 мл тестируемых образцов в соответствующие лунки микроплшета, содержащие разбавитель

для образцов, в рядах с 1 по 5.

С. Шаг 3: перенесите 0,050 мл каждого разбавленного образца пациента в рядах с 1 по 5 планшета для разведения образцов в соответствующие лунки (позиции) в рядах с 6 по 10.

4. Перед использованием приготовьте рабочий раствор конъюгата стрептавидин -HRP: концентрат конъюгата Стрептавидин - HRP (100X) разведите в 100 раз разбавителем для конъюгата стрептавидин HRP. (Например, 100 мкл концентрата конъюгата 100X стрептавидин -HRP + 9,9 мл разбавителя для конъюгата стрептавидин -HRP)

5. Рабочий промывающий буфер (1x): внесите 50 мл 20X промывочного буфера в 950 мл дистиллированной воды.

1X промывочный буфер стабилен при 2 - 8° С течение 30 дней.

Примечание: если в растворе из-за высокой концентрации соли присутствуют кристаллы, перед разведением они должны быть растворены при комнатной температуре.

6. Все другие реагенты готовы к использованию.

Пример расположения образцов в планшете для разведения образцов

	Первое разведение 1:10					Второе разведение 1:5 (итоговое 1:50)						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1-1	S9-1	S17-1	S25-1	S33-1	S1-2	S9-1	S17-2	S25-2	S33-2		
B	S2-1	S10-1	S18-1	S26-1	S34-1	S2-2	S10-1	S18-2	S26-2	S34-2		
C	S3-1	S11-1	S19-1	S27-1	S35-1	S3-2	S11-1	S19-2	S27-2	S35-2		
D	S4-1	S12-1	S20-1	S28-1	S36-1	S4-2	S12-1	S20-2	S28-2	S36-2		
E	S5-1	S13-1	S21-1	S29-1	S37-1	S5-2	S13-1	S21-2	S29-2	S37-2		
F	S6-1	S14-1	S22-1	S30-1	S38-1	S6-2	S14-1	S22-2	S30-2	S38-2		
G	S7-1	S15-1	S23-1	S31-1	S39-1	S7-2	S15-1	S23-2	S31-2	S39-2		
H	S8-1	S16-1	S24-1	S32-1	S40-1	S8-2	S16-1	S24-2	S32-2	S40-2		

1. Установите в рамку-держатель необходимое количество стрипов, дно лунок которых покрыто антителами к ST2.

2. Внесите 100 мкл калибраторов и разведенных образцов пациентов в соответствующие лунки, дно лунок которых покрыто антителами к ST2. Внесение образцов пациента, контрольных и калибровочных образцов необходимо произвести в течение 5 минут.

3. Инкубируйте микропланшет при комнатной температуре (18 - 25°С) в течение 60 минут при встряхивании со скоростью 750 оборотов в минуту.

4. Удалите содержимое лунок в контейнер для отходов.

а. Ручная промывка: Промойте лунки микропланшета 3 раза 1x промывочным буфером. Осторожно постучите микропланшетом по фильтровальной бумаге или бумажному полотенцу для удаления всех остатков буфера.

б. Автоматическая промывка: 350 мкл на лунку, 3 цикла с разведенным 1x промывочным буфером. После третьей промывки освободите камеры от буфера перевернув и поместив их на фильтровальную бумагу (при необходимости). Обратите внимание, чтобы при автоматической промывке промывающие наконечники располагались близко к поверхности камер, но не прикасались к ним и не царапали их поверхность.

5. Внесите в каждую лунку микропланшета по 100 мкл реагента Биотинилированных антител к ST2.

6. Инкубируйте микропланшет при комнатной температуре (18 - 25°С) в течение 60 минут при встряхивании со скоростью 750 оборотов в минуту.

7. Повторите шаг 4.

8. Внесите в каждую лунку по 100 мкл рабочего раствора конъюгата Стрептавидин-HRP.

9. Инкубируйте микропланшет при комнатной температуре (18 - 25°С) в течение 30 минут при встряхивании со скоростью 750 оборотов в минуту.

10. Повторите шаг 4.

11. Внесите в каждую лунку по 100 мкл ТМВ реагента.

12. Инкубируйте микропланшет при комнатной температуре (18 - 25°С) в течение 20 минут при встряхивании со скоростью 750 оборотов в минуту в темноте.

13. Внесите 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку.

14. Осторожно перемешайте в течение 30 секунд.

15. Считайте абсорбцию при 450 нм на микропланшетном ридере в течение 15 минут.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ:

1. Рассчитайте среднее значение оптической плотности (ОП 450) для каждого стандарта, контролей и образцов.

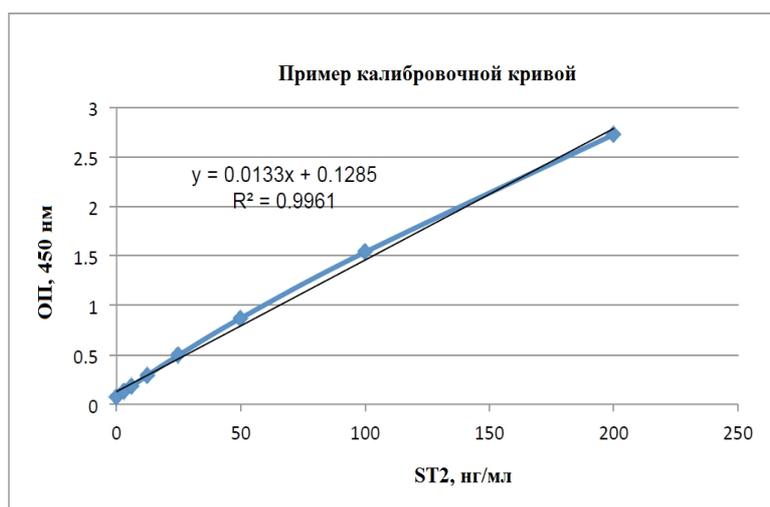
2. С использованием средних значений оптической плотности и концентраций в стандартах постройте калибровочную кривую.

3. По среднему значению абсорбции и соответствующим концентрациям ST2 (нг / мл) в стандартах (по стандартной кривой) определите содержание аналита в тестируемых образцах. Для расчета могут быть использованы функции математического расчета программы Excel или графические программы для расчета данных, такие как Graphpad PRISM ®.

Пример стандартной кривой представлен ниже.

Пример калибровочной кривой:

ST2 (нг/мл)	ОП 450
0	0.070
3.125	0.129
6.25	0.183
12.5	0.293
25.0	0.496
50.0	0.870
100.0	1.537
200.0	2.725



КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Набор Presage ST2 Assay control kit (продается отдельно) - это контрольные материалы в двух (2) концентрациях. Представляет собой запечатанные флаконы с лиофилизатами, которые необходимо развести водой — объем указан на этикетке флакона. Концентрации аналита в контроле с низким его содержанием находятся в диапазоне от 18,8 до 35 нг/мл; в контроле с высоким содержанием аналита - в диапазоне от 65,3 до 105 нг/мл. Для каждой партии контрольных материалов установлены целевые значения и диапазоны контроля качества, которые напечатаны на соответствующем сертификационном листе. Рекомендуется тестировать контрольные материалы при каждом проведении серии анализов (в дублях).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Аналитическая интерпретация

При проведении серии анализов необходимо строить калибровочную кривую. Она должна быть похожа на калибровочную кривую, представленную в приведенном выше примере. Результаты определения содержания аналита в двух контрольных материалах должны быть в пределах установленного диапазона. Если одно из этих условий не выполняется, пользователь должен проанализировать возможные причины и повторить проведение анализа.

Клиническая интерпретация

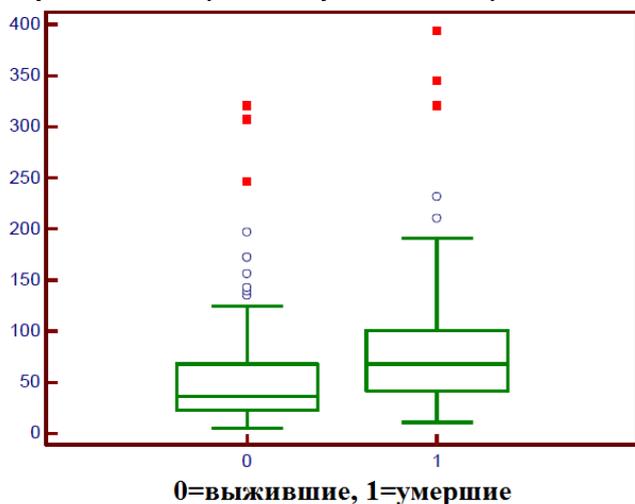
Оценку риска смертности и заболеваемости пациентов с серьезными и угрожающими жизни заболеваниями, такими как острый коронарный синдром или сердечная недостаточность, нельзя проводить обычным бинарным методом. Например, возраст является мощным предиктором смертности, при этом риск увеличивается с возрастом. Кроме того, риск смертности и заболеваемости у пациента возрастает с увеличением концентрации ST2. У пациентов с диагнозом острый коронарный синдром или сердечная недостаточность при концентрации ST2, превышающей 30 нг/мл (примерно 85 перцентиль у здоровых лиц) риск смертности в течение одного года (1) выше, чем у пациентов, у которых концентрация ST2 ниже этого уровня. Как показано на рисунке 3, риск смертности возрастает с увеличением концентрации ST2: относительный риск (ОР) смертности в течение 1 года составляет 1,7 между 1-м и 3-м тертилями.

В данной инструкции концентрации ST2 представлены только в качестве справочной информации. Клинические решения, основанные на концентрациях аналита у конкретного пациента, должны осуществляться в лечебном учреждении при совокупном анализе всех клинических данных.

Резюме: результаты клинических исследований

Для подтверждения предположения о том, что ST2 является предиктором смертности в течение 1 года в настоящем исследовании были проанализированы результаты обследования 368 пациентов с подтвержденным диагнозом сердечной недостаточности. На рисунке 1 показаны уровни ST2 у пациентов, умерших в течение одного (1) года в сравнении с выжившими больными.

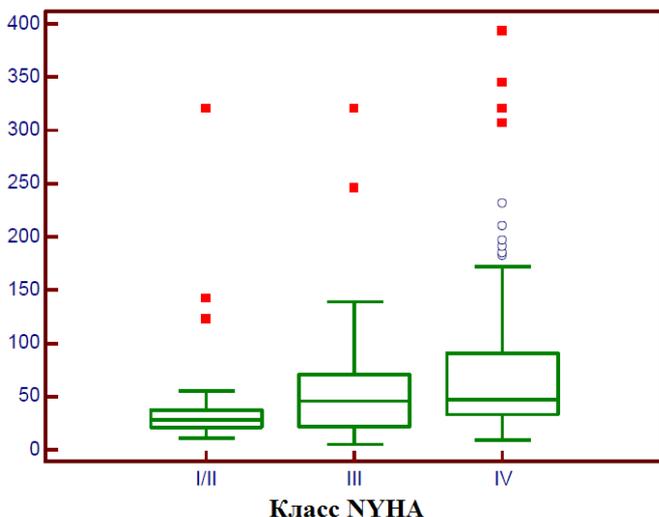
Рисунок 1: Концентрации ST2 у пациентов с сердечной недостаточностью



Результаты этого анализа показали, что у пациентов с сердечной недостаточностью, умерших в течение 1 года средняя концентрация ST2 составила 67,4 нг / мл (IQR 41,5 - 101,1) и была достоверно выше таковой у выживших пациентов, у данной группы больных средняя концентрация ST2 составила 36,1 нг / мл (IQR 23,1 - 67,5, P <0,0001 тест Крускала-Уоллиса).

Также в общей группе 368 пациентов с сердечной недостаточностью была обнаружена тенденция к повышению концентрации ST2 с увеличением тяжести сердечной недостаточности, оцениваемой по классификации NYHA (представлено на рисунке 2). В этом случае разница между концентрациями ST2 у пациентов с NYHA II и III классов, а также III и IV классов достоверная (p = 0,0008, тест Крускала-Уоллиса).

Рисунок 2: Концентрации ST2 и класс сердечной недостаточности по NYHA



Результаты Cox пропорционального регрессионного анализа риска смертности в течение 1 года (содержание ST2 трансформировано в натуральный логарифм $\ln e$), как в одно вариантной, так и в многовариантной модели, показали, что ST2 является значимым и независимым предиктором смертности в течение 1 года.

Таблица 1: Одновариантный анализ ST2 для оценки риска смертности в течение 1 года

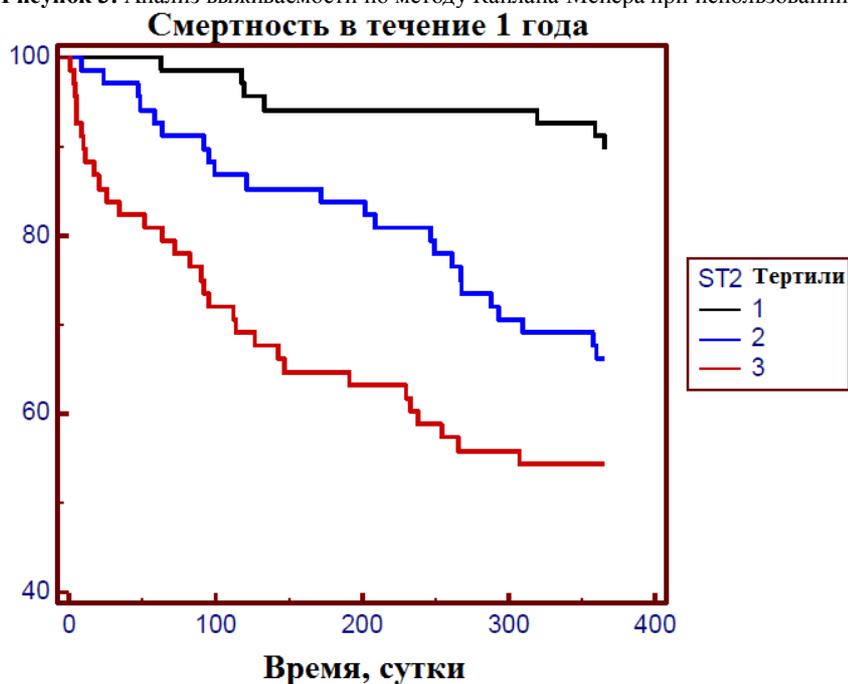
Относительный риск (HR)	P	95% доверительный интервал для HR
1.73	<0.0001	1.40 - 2.15

Таблица 2: Многовариантный анализ ST2 для оценки риска смертности в течение 1 года

Коварианта	HR	P	95% доверительный интервал для HR
loge ST2	1.67	0.0020	1.21 - 2.32
Возраст	1.05	0.0011	1.02 - 1.09
Фракция изгнания левого желудочка (LVEF)	0.995	0.5105	0.98 - 1.01
Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR)	0.99	0.0163	0.98 - 0.998
Класс NYHA	1.62	0.0335	1.04 - 2.52
Диабет	1.76	0.0377	1.04 - 2.98
Гипертония	0.74	0.3050	0.42 - 1.31

Анализ выживаемости по методу Каплана-Мейера был проведен при использовании тертилей содержания ST2. Результаты показали увеличение риска смертности с повышением концентрации ST2. Как показано на рисунке 3, риск смертности увеличивается с увеличением концентрации ST2. В этом анализе относительный риск (RR) между первым (самым низким) и третьим (самым высоким) тертилем составляет приблизительно 1,7 за один (1) год наблюдения.

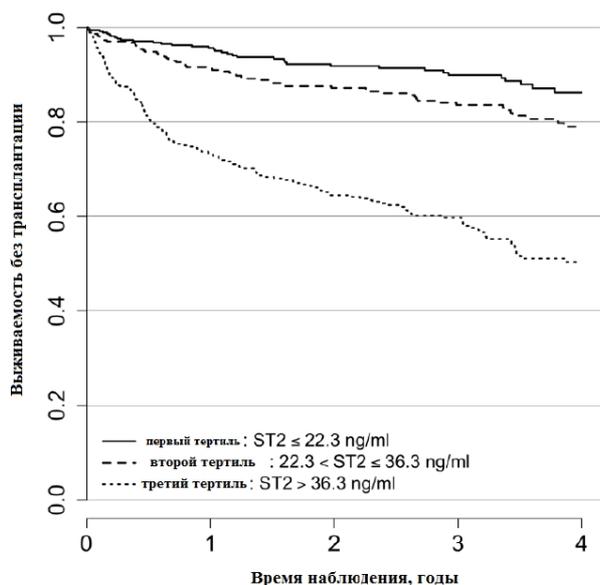
Рисунок 3: Анализ выживаемости по методу Каплана-Мейера при использовании тертилей содержания ST2



Дополнительные подтверждающие данные

Прогностическое значение ST2 также было оценено в когорте амбулаторных пациентов с хронической сердечной недостаточностью (готовится к публикации). Цель данного исследования - оценить предиктивное значение ST2 в большой когорте пациентов с сердечной недостаточностью и сравнить его показатели с таковыми для установленных предикторов риска. Во многоцентровом проспективном исследовании Penn Heart Failure Study измеряли содержание растворимой формы ST2 у 1141 пациента с хронической сердечной недостаточностью (широкий спектр тяжести заболевания). Эта оценка подтвердила силу и независимость связи концентрации ST2 с выживаемостью пациентов без необходимости проведения трансплантации и полезность использования ST2 для определения индивидуального риска для пациента. Прогностическое значение увеличивалось ST2 при его использовании в комбинации с двумя другими установленными предикторами риска: уровнем натрийуретического пептида и показателя сердечной недостаточности в Сиэтлской Модели (SHFM). На рисунке 4 показаны результаты анализа выживаемости по Каплан-Мейеру в зависимости от концентраций ST2, разделенных на тертили для этой когорты пациентов. В этом анализе показатель относительного риска (OR) между первым (самым низким) и третьим (самым высоким) тертилем составляет примерно 1,5 на один (1) год наблюдения и примерно 1,7 на 4 (четыре) года. Эти результаты показывают, что ST2 является значительным прогностическим фактором риска у пациентов с СН в течение четырех лет.

Рисунок 4: Концентрации ST2 прогнозируют выживаемость пациентов с ХСН в течение 4 лет



Прогностическое значение ST2 также оценивали у пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС), у некоторых из которых развился инфаркт миокарда (ИМ). В докладе, сделанном Sabatine и соавт. в 2008 году по результатам работы, в которой приняли участие более чем 1200 пациентов с ОКС и инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST (STEMI) было показано, что ST2 имеет высокое прогностическое значение для оценки риска смертности в течение 30 дней после развития события. Результаты исследования, опубликованного Eggars, и соавт. в 2010 году, в котором принял участие 401 больной с ОКС, подтвердили, что при развитии инфаркта миокарда без подъема ST сегмента (NSTE), концентрация ST2 повышается в течение раннего периода и является независимым прогностическим фактором. ST2 может быть использован для оценки риска смертности в течение одного (1) года.

В таблице 3 приведены результаты логистического регрессионного анализа для оценки риска смертности в течение одного (1) года. В качестве непрерывной переменной использовались натуральные логарифмы концентрации ST2 (loge) в образцах пациентов, собранных при развитии приступа. Установлено, что ST2 является значительным и независимым предиктором смертности у больных с ОКС\NSTE.

Таблица 3: Прогностическое значение ST2 у пациентов с ОКС, а также NSTE

Модель 1			Модель 2		
N	ОР (95% ДИ)	вероятность, p	N	ОР (95% ДИ)	вероятность, p
401	2.5 (1.4-4.5)	0.003	398	2.3 (1.1-4.6)	0.025

Модель 1: без оценки дополнительных факторов

Модель 2: добавлены одновариантные предикторы смертности (возраст, застойная сердечная недостаточность, диабет, предшествующий ОИМ, предшествующий инсульт)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Концентрации ST2, измеренные при развитии у пациентов с сердечной недостаточности (СН) или острого коронарного синдрома (ОКС), являются значимым и независимым прогностическим фактором риска смертности в течение одного (1) года. Таким образом, определение концентрации ST2 может быть использовано для оценки риска смертности у данных пациентов.

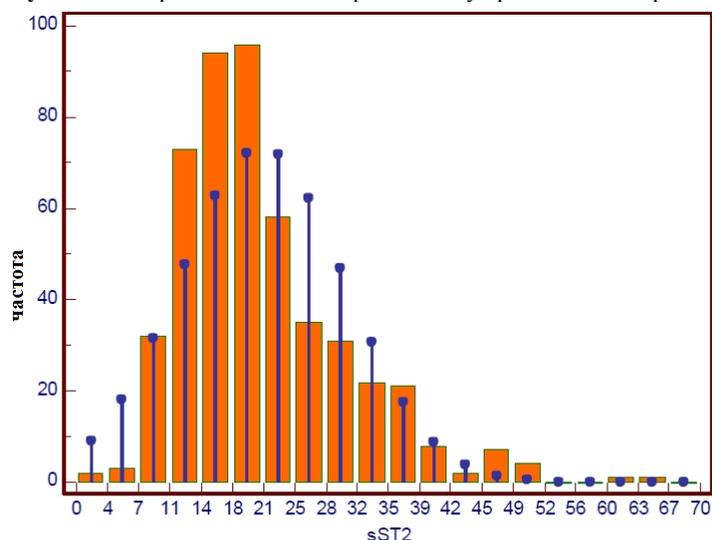
ДИАПАЗОН НОРМАЛЬНЫХ ЗНАЧЕНИЙ

Были измерены концентрации ST2 у практически здоровых лиц и определены границы референсных значений. В исследовании приняли 490 практически здоровых лиц (доноров), когорта состояла в равной степени из мужчин и женщин, возраст доноров составил от 18 до 84 лет, 40 из них старше 70 лет. Доноры не были протестированы дополнительно по другим биомаркерам или обследованы каким-либо другим образом.

В таблице 4 приводится сводная информация о количестве лиц в каждой возрастной группе и распределение по полу в когорте практически здоровых лиц. На рисунке 5 представлена гистограмма распределения концентраций ST2 для этой когорты доноров.

Таблица 4: Когорта практически здоровых лиц

Количество лиц в зависимости от возраста (по декадам)							
	<30	30-39	40-49	50-59	60-69	>70	Общее
Женщины	61	35	53	39	38	19	245
Мужчины	65	47	40	41	31	21	245
Общее	126	82	93	80	69	40	490

Рисунок 5: Распределение концентраций ST2 у практически здоровых лиц.

На приведенном выше графике оранжевые столбики представляют фактическую частоту концентраций ST2 в зависимости от диапазонов, а синие линии представляют теоретическое нормальное распределение. Распределение концентраций у этих здоровых лиц не является нормальным (хи-квадрат для нормального распределения $p < 0,0001$).

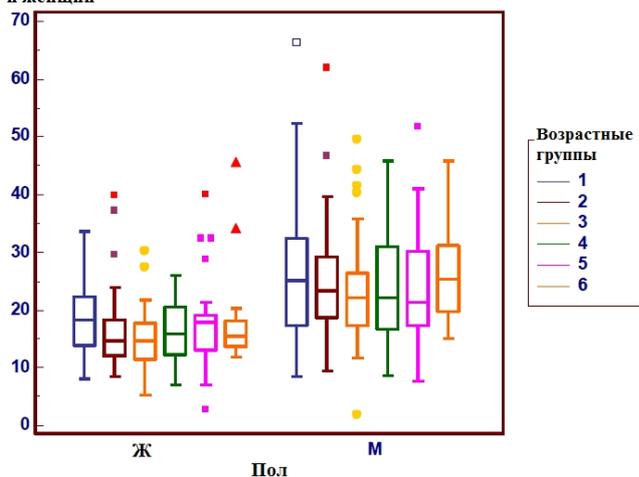
Тем не менее, после того, как концентрации ST2 были трансформированы по \log_e , распределение приблизилось к нормальному (хи-квадрат для нормального распределения $p < 0,146$). В таблице 5 приведена сводная статистика распределения концентраций для этой когорты здоровых лиц.

Таблица 5: Концентрации ST2 и диапазоны перцентилей у практически здоровых лиц.

Параметр	ST2 (нг/мл)	95% ДИ
Медиана	18.8	18.1 - 19.9
25 перцентиль	14.5	13.7 - 15.3
75 перцентиль	25.3	23.8 - 27.0
80 перцентиль	27.8	25.5 - 29.5
90 перцентиль	34.3	32.2 - 35.7
95 перцентиль	37.9	35.6 - 41.6
97.5 перцентиль	45.6	39.5 - 48.8

В когорте практически здоровых лиц (оценено самостоятельно) не обнаружено изменений концентраций ST2 в зависимости от возраста (критерий Крускала-Уоллиса, мужчины $p = 0,501$, женщины $p = 0,056$) однако концентрации в зависимости от пола значительно отличались (критерий Крускала-Уоллиса $p < 0,0001$). На рисунке 6 показаны уровни ST2 в зависимости от возраста и пола. Таким образом, с использованием непараметрического процентильного метода были рассчитаны гендерные, но не возрастные референсные значения (95% двусторонний ДИ). Результаты по полу и для общей когорты также представлены в таблице 6.

Рисунок 6: Распределение концентраций ST2 в зависимости от возраста и пола у практически здоровых лиц. Уровни sST2 в различных возрастных группах у мужчин и женщин



На данном графике возрастные группы следующие: 1=<30, 2=30-39, 3=40-49, 4=50-59, 5=60-69 и 6= \geq 70

Таблица 6: Референсные значения в когорте практически здоровых лиц

Параметр/Группа	Общая группа	Мужчины	Женщины
N	490	245	245
Среднее значение ST2 (нг/мл)	18.8	23.6	16.2
95% доверительный интервал	18.1 – 19.9	21.3 – 25.1	15.3 - 17.4
Межквартильный интервал	14.5 – 25.3	17.6 – 30.6	12.4 - 19.9
Референсный диапазон (95%)	1.75 – 34.3	8.5 – 49.3	7.1 – 33.5

На основании анализа 95 перцентиля референсный диапазон для здоровых мужчин составил 8.5-49.3 нг/мл (медиана 23.6 нг/мл), у женщин - 7.1-33.5 нг/мл (медиана 16.2 нг/мл) и в общей группе 1.75-34.3 (медиана 18.8 нг/мл).

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Точность

Оценку точности анализа проводили в соответствии с рекомендациями Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI), раздел EP5-A. Четыре образца плазмы крови (4) пациентов объединили и разлили на аликвоты в двадцать пластиковых пробирок по 1,5 мл для каждого уровня концентрации и заморозили при -80°C . Эти образцы анализировали в дублях, одна серия анализов в день в течение 20 дней. Общую аналитическую неточность и неточность между сериями анализов (CVA) рассчитывали с помощью стандартов для клинической лабораторной диагностики для оценки точности одной серии анализов. CVA для серии анализов составили 6,5% и в общем CVA - 9,1% при средней концентрации 16,9 нг / мл (низкий уровень), CVA для серии анализов составили 3,4% и в общем CVA - 5,5% при средней концентрации 33,1 нг / мл (средний уровень - 1), CVA для серии анализов составили 3,8% и в общем CVA - 6,3% при средней концентрации 68.7 нг / мл (средний уровень - 2), CVA для серии анализов составили 2,4 %, а в общем CVA 4,8% при средней концентрации 159,1 нг / мл (высокий уровень).

Таблица 7: Обобщенные данные по точности анализа

Образец	Средняя концентрация ST2 (нг/мл)	В серии анализов		Общее	
		SD	CV	SD	CV
1	16.9	1.09	6.5%	1.54	9.1%
2	33.1	1.12	3.4%	1.83	5.5%
3	68.7	2.64	3.8%	4.32	6.3%
4	159.1	3.77	2.4%	7.68	4.8%

Не обнаружено значительных расхождений при проведении анализа в клинически значимых диапазонах значений концентраций аналита.

Чувствительность

Пределы чувствительности были определены в соответствии с рекомендациями CLSI, раздел EP17. Для определения предела чувствительности бланка (LoB) проводили как минимум 60 измерений разбавителя калибратора, в течение 4 дней, по крайней мере по 15 повторов в день. Для определения предела чувствительности (LOD) были протестированы четыре (4) уникальных образца плазмы с низким содержанием SST2. Каждый образец измеряли в течение четырех (4) дней подряд по 15 повторных измерений в сутки. Для оценки LoQ образцы из анализа по определению LoD были использованы и вычислены смещение и неточность. Уравнение для расчета LoQ следующее: $LoQ = \text{смещение} + 2 * Sds$. Четыре (4) дополнительных образца в том же диапазоне низких концентраций были использованы для расчета LoQ. В таблице 7 приведены значения LoB, LoD и LoQ.

Таблица 8: Обобщенные данные определения аналитической чувствительности

Параметр	Значение
Предел чувствительности для бланка (LoB)	0.5 нг/мл
Предел чувствительности (LoD)	1.8 нг/мл
Предел определения (LoQ)	2.4 нг/мл

Значение LoQ незначительно выше пятого перцентиля диапазона нормальных значений (1,71 нг / мл), и несколько ниже, чем самая низкая концентрация калибратора рекомендуемого для стандартной кривой (3,125 нг / мл).

Линейность

Для определения линейности в соответствии с рекомендациями руководства CLIS по оценке линейности количественных измерений (EP6-A) были получены свежие образцы плазмы крови с концентрациями ST2 охватывающих диапазон для количественного определения аналита. Для этого анализа подготовили пул образцов с высокой концентрацией аналита, немного большей, чем 200 нг/мл (верхний предел калибровочной кривой ($Abs450 > 3,0$)) и пул образцов с низкой концентрацией аналита (в среднем 9,9 нг/мл ($Abs450 = 0,359$)), меньше, чем средняя концентрация у здоровых доноров (18,8 нг / мл). Эти образцы охватывают весь диапазон определяемых концентраций. Проведена серия разведений одиннадцати (11) образцов с низкой и высокой концентрацией аналита (два пула с низким и высоким содержанием) в следующих объемных соотношениях (пул с низким содержанием + пул с высоким содержанием): пул 1, только высокое содержание; пул 2, 0,1 пул с низким содержанием + 0,8 с высоким; пул 3, 0,2 пул с низким содержанием + 0,7 с высоким; пул 4, 0,3 пул с низким содержанием + 0,6 с высоким, далее с шагом 0,1 для каждого пула до конечного пула 11, с только низкой концентрацией. Каждый пул измерялся в повторях шесть раз (6). В двух образцах с наибольшим содержанием аналита (2) концентрация превысила верхний предел обнаружения (EUL), при этом значение оптической плотности при ($Abs450$) превышала 3,0 (максимальный предел для считывания ридеров). Поэтому для анализа линейности были использованы девять (9) образцов. Повторяемость в этом анализе была высокой, CV <5% на всем диапазоне концентраций, разведения были линейными $R^2 = 0,9939$. Для проведения линейного регрессионного анализа данных использовали программное обеспечение Analyze-it для Excel версии 2.21 с заданными пределами линейности 5 нг/мл или 10%. Обобщенные результаты анализа линейности представлены на рисунке 7 и в таблице 9.

Рисунок 7: График результатов анализа линейности

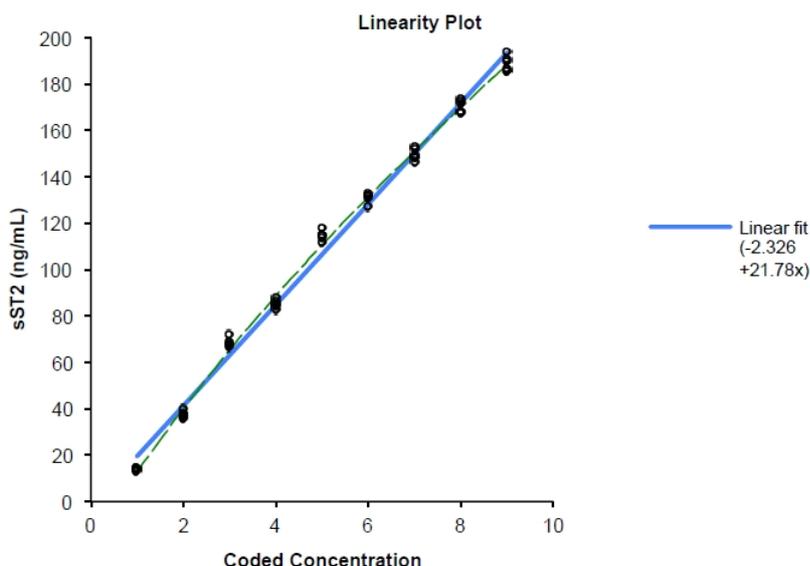


Таблица 9: Обобщенные данные анализа линейности.

Пул	Среднее sST2	Линейная форма	Нелинейная форма	Нелинейность	Нелинейность %	Нелинейная цель	Достижимость линейной цели
1	13.84	19.45	12.84	-6.61	- 47.8%	5.00	нет
2	37.44	41.23	40.11	-1.13	- 3.0%	5.00	да
3	68.27	63.01	65.35	2.34	3.4%	6.83	да
4	85.22	84.79	88.83	4.04	4.7%	8.52	да
5	114.69	106.57	110.79	4.22	3.7%	11.47	да
6	131.01	128.35	131.48	3.14	2.4%	13.10	да
7	149.57	150.13	151.16	1.04	0.7%	14.96	да
8	170.31	171.91	170.08	-1.83	-1.1%	17.03	да
9	188.77	193.68	188.48	-5.21	-2.8%	18.88	да

Данные этого анализа подходят для уравнения как первого, так и второго порядка, однако результаты уравнения второго порядка находятся в пределах, определенных для уравнения первого порядка. Таким образом, линейность анализа в указанном диапазоне является приемлемой.

Интерференции

Потенциальный эффект антикоагулянтов был изучен в сорока пяти (45) образцах (здоровых доноров и пациентов отделений скорой помощи). Образцы плазмы крови собирали с использованием наиболее распространенных типов антикоагулянтов (ЭДТА, гепарин), также для анализа использовали сыворотку крови. Анализ проводился сразу же после обработки и центрифугирования образцов по стандартной методике. Для каждого сравнения характерно высокое значение R², 0,998 и 0,996. Не обнаружено различий при использовании разных типов образцов. Тестирование интерферирующих веществ проводилось в соответствии с рекомендациями CLSI по протоколу EP7-A2 для пяти (5) наиболее распространенных соединений (общий белок (БСА), триглицериды, гемоглобин, холестерин и билирубин) в трех (3) образцах пулированной ЭДТА плазмы крови человека, в которой были ранее измерены концентрации ST2: 1 с низкой (норма) концентрацией ST2 (~ 15 нг/мл), 1 со средней концентрацией ST2 (~ 25 нг / мл) и 1 с высокой концентрацией ST2 (~ 100 нг / мл), диапазон от 0,3 до 10 мг / мл. Каждый пул плазмы был протестирован в восьми (8) повторях с разбавителем интерферирующего вещества, в двух его концентрациях (2). Влияние интерферирующих веществ было установлено за счет сравнения результатов анализа концентрации ST2 в каждом образце, содержащем интерферирующее вещество и в образцах с разбавителем. Никаких существенных влияний не наблюдалось ни у одного из пяти (5) тестируемых веществ.

ЛИТЕРАТУРА

См. английскую инструкцию

Информация для заказа

**Набор можно заказать в
ЗАО «БиоХимМак»:
119192, г. Москва, Ломоносовский пр., д.29, стр.1
Тел. (495) 6472740,
E-mail: elisa@biochemmack.ru**