

УТВЕРЖДЕНА

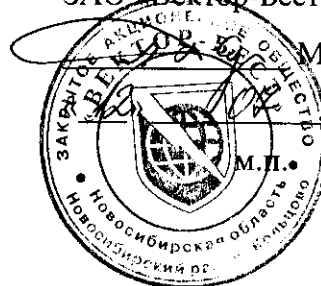
Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации тропонина I в сыворотке крови
(Тропонин I – ИФА – БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «Тропонин I – ИФА – БЕСТ» предназначен для определения концентрации тропонина I в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Тропонин представляет собой белковый комплекс, состоящий из 3 белков: тропонин I, тропонин T, тропонин C. Он входит в состав сократительной системы миоцита и выполняет функцию кальцийзависимого «переключателя» сокращения мышечного волокна. Известны три изоформы тропонина I, одна из которых присутствует только в кардиомиоцитах, а две – в поперечнополосатой мускулатуре. Кардиоспецифический тропонин I имеет молекулярную массу около 22,5 кДа, и структурно отличается от изоформ скелетных мышц (на N-терминальном конце имеет дополнительно 30 аминокислот), Тропонин I является высокочувствительным и высокоспецифическим маркером повреждения миокарда. Выраженная, но кратковременная ишемия, не сопровождающаяся гибелью кардиомиоцитов, не приводит к повышению концентрации тропонина в крови. Некроз миокарда сопровождается поступлением тропонина в периферический кровоток. В этом случае концентрация тропонина I начинает возрастать в сыворотке крови через 4–6 часов от начала острого коронарного синдрома, достигает пика через 12–24 часа и возвращается к норме через 7–14 дней, что обуславливает значительное увеличение «диагностического окна» для выявления повреждения сердечной мышцы.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. Директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, зав. лабораторией Н.Н. Сорокиной и м.н.с. С.В. Шеметовым.

d

После успешного проведения тромболизиса наблюдается большой подъем уровня тропонина I по сравнению с пациентами со стойкой окклюзией коронарных артерий, обусловленный феноменом вымывания.

1.3. В комплексе с другими диагностическими методами количественное определение содержания тропонина I в сыворотке крови человека может использоваться для диагностики инфаркта миокарда, оценки реперфузии после применения тромболитической терапии, выделения групп высокого коронарного риска среди больных острым коронарным синдромом без подъема сегмента ST и блокадой пучка Гиса.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного образца, 6 калибровочных образцов и 1 контрольного образца (всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на одностадийном твердофазном иммуноферментном анализе с применением двух типов моноклональных антител.

В лунках планшета при добавлении исследуемого образца и конъюгата, во время инкубации происходит связывание тропонина I с моноклональными антителами к тропонину I, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок, и моноклональными антителами к тропонину I, конъюгированными с пероксидазой. После удаления избытка несвязавшегося конъюгата, во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации тропонина I в анализируемых образцах. После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация тропонина I в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

– планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к тропонину I, готовый для использования – 1 шт.;

– калибровочные образцы на основе сыворотки крови человека, аттестованные относительно стандарта «Liquichek Cardiac Markers Plus Control» (фирма BioRad, Франция), содержащие известные количества тропонина I – 0; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 6,0 нг/мл, концентрации тропонина I в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках пробирок, готовые для использования – 6 флаконов (по 1,3 мл);

- контрольный образец на основе сыворотки крови человека с известным содержанием тропонина I, готовый для использования – 1 флакон (1,3 мл);
- конъюгат моноклональных антител к тропонину I с пероксидазой хрена, концентрат – 1 флакон (0,7 мл);
- раствор для разведения сывороток (PPC) – 1 флакон (12,0 мл);
- раствор для разведения конъюгата (PPK) – 1 флакон (13,0 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28,0 мл);
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 флакон (13,0 мл);
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент (0,5 М серная кислота), готовый для использования – 1 флакон (12,0 мл);

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 1 шт.;
- трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- ванночкой для реагентов – 2 шт.;
- наконечниками для пипеток на 4 – 200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Используемые в наборе реагентов моноклональные антитела обеспечивают высокую специфичность выявления тропонина I.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания тропонина I в одном и том же образце с использованием набора «Тропонин I – ИФА – БЕСТ» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Отклонение от расчетной величины концентрации тропонина I при разведении анализируемых проб сывороткой крови, не содержащей тропонина I, не превышает 10% в диапазоне концентраций 0,1-6,0 нг/мл.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации тропонина I предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца 0,3 нг/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация тропонина I не превышает 0,02 нг/мл.

3.6. Клиническая проверка. Концентрация тропонина I, измеренная в сыворотке крови 326 здоровых лиц юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20–80 лет с ис-

пользованием набора «Тропонин I – ИФА – БЕСТ», не превышала 0,1 нг/мл, при этом средняя концентрация составила 0,03 нг/мл.

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации тропонина I, соответствующие нормальным для данного региона у обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в



двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 655 нм;

- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре 37 ± 1 °С и 400-800 об/мин;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 5-5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкости 10, 100 и 300 мкл;
- промывочное устройство для планшетов;
- флаконы стеклянные вместимостью 10-15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- колбы вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови.

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре 2-8 °С не более 5 сут или при температуре минус 20°С (и ниже) не более 3 мес.

Повторное размораживание образцов сыворотки крови не допускается.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000-1500 об/мин в течение 5 мин при температуре 18-25 °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре 18-25 °С в течение времени не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок; хранить при температуре 2–8 °С в течение всего срока годности.

7.3. Приготовление калибровочных образцов и контрольного образца

Калибровочные и контрольный образцы готовы к использованию.

Перед проведением анализа флаконы с калибровочными образцами и контрольным образцом встряхнуть.

7.4. Приготовление промывочного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре 30-40 °С до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре 2-8 °С не более 5 сут.

Таблица

Кол-во используемых стрипов	Промывочный раствор		Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор тетраметилбензидина	
	25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, мл	Дистиллированная вода, мл	Конъюгат, концентрат, мл	Раствор для разведения конъюгата, мл	Концентрат тетраметилбензидина, мл	Субстратный буферный раствор, мл
2	4,0	до 100	0,10	1,0	0,14	2,0
3	6,0	до 150	0,15	1,5	0,21	3,0
4	8,0	до 200	0,20	2,0	0,28	4,0
5	10,0	до 250	0,25	2,5	0,35	5,0
6	12,0	до 300	0,30	3,0	0,42	6,0
7	14,0	до 350	0,35	3,5	0,49	7,0
8	16,0	до 400	0,40	4,0	0,56	8,0
9	18,0	до 450	0,45	4,5	0,63	9,0
10	20,0	до 500	0,50	5,0	0,70	10,0
11	22,0	до 550	0,55	5,5	0,77	11,0
12	24,0	до 600	0,60	6,0	0,84	12,0

7.5. Приготовление рабочего раствора конъюгата

Готовится в стеклянном флаконе за 5-10 мин до начала анализа.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре 18-25 °С не более 3 ч.

7.6. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина

Готовится в стеклянном флаконе за 5-10 мин до окончания инкубации.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищённом от света месте при температуре 18-25 °C не более 3 ч.

7.7. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл каждого калибровочного образца и по 100 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дубликатах по 100 мкл анализируемых образцов сыворотки крови.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 15-20 мин.

7.8. Внести во все лунки по 50 мкл рабочего раствора конъюгата (см п. 7.5).

Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.9. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37°C, с интенсивностью перемешивания 700 об/мин.

7.10. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.4.). При этом в каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе одного промывания.

Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. По окончании каждой промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

7.11. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (см. п. 7.6) и инкубировать в темноте в течение 15 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37°C, с интенсивностью перемешивания 700 об/мин.

Для внесения рабочего раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.12. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и рабочий раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента; при этом содержимое лунок окрашивается в жёлтый цвет.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху). Измерение проводить не позднее 10 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации тропонина I в калибровочных образцах (нг/мл).

9.2. Определить содержание тропонина I в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

9.3. Если концентрация тропонина I в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 6 нг/мл, образцы следует развести раствором для разведения сывороток в 10 раз (20 мкл исследуемого образца + 180 мкл раствора для разведения сывороток), повторить анализ и полученный результат умножить на 10.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов «Тропонин I – ИФА – БЕСТ» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности (9 мес). Допускается хранение набора при температуре до 25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.3. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

– неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре 2–8 °С в течение всего срока годности;

– 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, субстратный буферный раствор, раствор для разведения сывороток, раствор для разведения конъюгата и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре 2–8 °С в течение всего срока годности;

– концентрат тетраметилбензидина после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре 2–8 °С в течение всего срока годности;

– калибровочные образцы, контрольный образец и концентрат конъюгата после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре 2–8 °С в течение всего срока годности;

– рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре 18–25 °С не более 3 ч;

– промывочный раствор можно хранить при температуре 2–8 °С не более 5 сут;

– рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при температуре 18–25 °С не более 3 ч.

10.4. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации тропонина I в контрольном образце.

10.5. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре 2–8 °С не более 5 суток или при температуре минус 20 °С (и ниже) не более 3 мес, допускается однократное замораживание-размораживание образцов сыворотки крови.

10.6. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.7. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, СБР, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

По вопросам, касающимся качества набора «Тропонин I – ИФА – БЕСТ», следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 227-67-64, 336-60-60, тел./факс (383) 336-73-46, 336-60-30

и в Лабораторный центр ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу:

117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (495) 120-60-95; 120-60-96.

Зав. лабораторией
ЗАО «Вектор-Бест»

Н.Н. Сорокина

Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

Зам. директора по научной работе Московского
Областного Научно-исследовательского
Клинического Института им. М.Ф. Владимирского
(МОНИКИ)



В.И. Шумский



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
10 (десять) листов

И. (Сергеева Е.А.)