

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

 М.Д. Хусаинов

«21» _____ 2016 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для высокочувствительного иммуноферментного
определения концентрации С-реактивного белка в сыворотке крови
(СРБ-ИФА-БЕСТ высокочувствительный)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для высокочувствительного иммуноферментного определения концентрации С-реактивного белка в сыворотке крови «СРБ-ИФА-БЕСТ высокочувствительный» предназначен для высокочувствительного определения концентрации С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Определение концентрации С-реактивного белка как белка острой фазы и неспецифического маркера воспаления может быть использовано в клинической диагностике для определения активности воспалительной составляющей заболеваний различного генеза и для оценки динамики процесса на фоне проводимого лечения. Определение СРБ с помощью высокочувствительного метода имеет особую ценность, поскольку выводит СРБ в разряд важных прогностических кардиомаркеров, позволяющих контролировать риск развития сердечно-сосудистых заболеваний.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 исследуемых, 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 «сэндвич» – варианте твердофазного иммуноферментного анализа с применением моноклональных антител к СРБ.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, ст. научным сотрудником НИИ СД С.Е. Гладковой.

В лунках планшета при добавлении исследуемого образца и конъюгата, во время инкубации происходит связывание С-реактивного белка с моноклональными антителами к СРБ, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок планшета, и конъюгатом моноклональных антител к СРБ с пероксидазой хрена. После удаления избытка несвязавшегося конъюгата, во время инкубации с раствором тетраметилбензидина плюс происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски пропорциональна концентрации СРБ в анализируемых образцах. После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация СРБ 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 СРБ, готовый для использования – 1 шт.;
 - калибровочные образцы, содержащие известные количества СРБ – 0; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10 МЕ/л, аттестованные по WHO International Standard HUMAN C-REACTIVE PROTEIN 1st international Standard NIBSC 85/506, концентрации СРБ в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках пробирок, готовые для использования – 6 пробирок (по 0,15 мл);
 - контрольный образец на основе инактивированной сыворотки крови человека с известным содержанием СРБ, аттестованный по WHO International Standard HUMAN C-REACTIVE PROTEIN 1st international Standard NIBSC 85/506; не содержащий антитела к ВИЧ-1, 2 и вирусу гепатита С, HBsAg, и антиген р24 ВИЧ-1, готовый для использования – 1 пробирка (0,15 мл);
 - конъюгат моноклональных антител к СРБ с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
 - раствор для разведения сывороток – 2 флакона (по 25 мл);
 - концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином – 1 флакон (28 мл);
 - раствор тетраметилбензидина плюс, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
 - стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).
- Принадлежности:
- плёнка для заклеивания планшета – 1 шт.;
 - трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;
 - ванночка для реагентов – 2 шт.;
 - наконечники для дозатора на 5-200 мкл – 16 шт.;
 - планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Специфичность высокочувствительного анализа обеспечивается использованием моноклональных антител, обладающих высокой специфичностью к СРБ.

3.2. * Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения СРБ в контрольном образце не превышает 8%.

3.3. * Линейность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «линейность» - отклонение от расчетной величины концентрации СРБ при разведении калибровочных образцов, содержащих 10 МЕ/л, 5 МЕ/л, 2 МЕ/л, 1 МЕ/л в 2 раза. Процент «линейности» составляет: 90-110 %.

3.4. * Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации СРБ предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца 1,0 МЕ/л. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. * Чувствительность. Минимально определяемая концентрация СРБ, рассчитанная на основании среднего арифметического значения оптической плотности калибровочного образца B_0 плюс 2σ (среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения B_0) не превышает 0,05 МЕ/л.

3.6. «Хук»-эффект высоких концентраций при исследовании сывороток крови не обнаружен до концентрации 200 МЕ/л.

3.7. Клиническая проверка. Концентрация СРБ, измеренная в сыворотке крови, взятой у 237 условно здоровых мужчин и женщин юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20-50 лет, не превышала 5 МЕ/л.

В группе стационарных больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, в которую вошли 12 больных с ишемической болезнью сердца, 18 больных с нестабильной стенокардией и 14 больных с острым инфарктом миокарда, были больные с низким, средним и высоким риском развития осложнений. При этом значения СРБ распределились следующим образом:

в группе с низким риском осложнений уровень СРБ составлял менее 1 МЕ/л;

в группе со средним риском – не более 3 МЕ/л;

в группе высоким риском – более 3 МЕ/л.

3.8. Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации СРБ, соответствующее нормальному для данного региона у обследуемого контингента людей.

* по ГОСТ Р 51352-2013.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

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 исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г. и в методических указаниях МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

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 посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

4.8. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм;

- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре 37 ± 1 °С и 400-800 об/мин;
- микроцентрифуга, позволяющая центрифугировать при 1500-2000 об/мин;
- термостат, поддерживающий температуру 37 ± 1 °С;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- дозатор полуавтоматический многоканальный со сменными наконечниками, позволяющий отбирать объёмы жидкостей от 5 до 350 мкл;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- 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 от 2 до 8°С не более 48 ч, при температуре минус 20°С (и ниже) не более 6 месяцев.

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 от 18 до 25 °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы следует выдерживать при температуре от 18 до 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 от 2

до 8 °С в течение всего срока годности.

7.3. Приготовление промывочного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином (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.

7.4. Приготовление калибровочных и контрольного образцов

Калибровочные и контрольный образцы готовы к использованию.

Перед проведением анализа пробирки с калибровочными образцами и контрольным образцом встряхнуть или центрифугировать на микроцентрифуге так, чтобы капли растворов со стенок и крышки опустились на дно. Затем содержимое пробирок тщательно перемешать пипетированием, избегая вспенивания.

После отбора части содержимого тщательно укуренные пробирки хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

7.5. Подготовка исследуемых сывороток

Проводится в лунках планшета для предварительного разведения исследуемых сывороток за 5-10 мин до начала постановки анализа.

В лунки планшета для предварительного разведения внести: 90 мкл раствора для разведения сывороток (RPC) + 10 мкл исследуемой сыворотки, тщательно перемешать (раствор А); 90 мкл RPC + 10 мкл раствора А, тщательно перемешать (разведение в 100 раз).

Разведенные исследуемые сыворотки можно хранить при температуре от 18 до 25 °С не более 30 мин.

7.6. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА конъюгат утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

Конъюгат после первого вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

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

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс.

Раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс) готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ плюс отобрать в ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА раствор ТМБ плюс утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ плюс).

Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ плюс.

Раствор ТМБ плюс после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

Таблица

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл		
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

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

7.8. Стоп-реагент готов к использованию. После первого вскрытия стоп-реагент можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.9. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 10 мкл каждого калибровочного образца и по 10 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дубликатах по 10 мкл анализируемых образцов сыворотки крови предварительно разведенных в 100 раз (см п. 7.5).

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение не более 10 мин.

7.10. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см п. 7.6).

Тщательно перемешать в течение 30 сек на шейкере или при помощи дозатора (5–6 круговых движений, во время которых следует 3–4 раза набрать и опорожнить наконечник), избегая образования пены.

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники.

7.11. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в термостате при температуре 37 ± 1 °C в течение 45 мин.

7.12. По окончании инкубации снять липкую пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть, добавляя во все лунки по 350 мкл промывочного раствора (см. п. 7.3). Процесс промывки повторить еще 4 раза. Общее количество отмывок равно 5. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. Затем удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.13. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (см п. 7.7) и инкубировать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре 18-25 °C.

Для внесения раствора тетраметилбензидаина плюс использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники.

7.14. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидаина, по 100 мкл стоп-реагента.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на фотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм. Допускается измерение только при длине волны 450 нм. Измерение проводить через 2-3 мин после остановки реакции в один прием во всех использованных лунках планшета.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные образцы.

9.2. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации СРБ в калибровочных образцах (МЕ/л).

9.3. Определить содержание СРБ в контрольном образце и исследуемых образцах по калибровочному графику. Вычислить среднее арифметическое значение концентрации для каждой пары лунок, содержащих контрольный и исследуемые образцы.

9.4. Если концентрация СРБ в исследуемом образце превышает 10 МЕ/л, то данный образец анализируют повторно, после дополнительного разведения на РРС в 10 раз (т.о. конечное разведение данного образца 1:1000) для этого добавить к 90 мкл РРС 10 мкл предварительно разведенной в 100 раз исследуемой сыворотки, перемешать. Результаты, полученные для образцов разведенных в 1000 раз, умножаются на 10 (на величину дополнительного разведения). Если в исследуемом образце ожидается высокое содержание СРБ (острая фаза бактериальной или вирусной инфекции, травма, инфаркт и т.д.), такие образцы сразу следует разводить в 1000 раз.

9.5. Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации СРБ в контрольном образце соответствует указанному диапазону концентраций на этикетке пробирки.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов «СБР-ИФА-БЕСТ высокочувствительный» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (12 мес).

10.2. Транспортирование наборов должно производиться всеми видами крытого транспорта с соблюдением условий и требований, установленных на данном виде транспорта, при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование набора при температуре до 25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

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 от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

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

- раствор тетраметилбензидина плюс после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- калибровочные образцы, контрольный образец после вскрытия пробирок можно хранить в плотно закрытых пробирках при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

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

10.4. Для представления результатов измерений концентрации СРБ в мг/л следует использовать коэффициент пересчёта 1,020 (1 МЕ/л СРБ = 1,020 мг/л СРБ).

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

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

10.7. Не допускается применение серии набора по истечении срока ее годности.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «СБР-ИФА-БЕСТ высокочувствительный», 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

Ст. научный сотрудник
ЗАО «Вектор-Бест»



С.Е. Гладкова

Директор НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»



М.Ю. Рукавишников

«СОГЛАСОВАНО»
Проректор по научной работе
ГБОУ ВПО НГМУ Минздрава России



Т.И. Пospelова



Прошнуровано, пронумеровано
скреплено печатью 10 листов

Отв. за учет договоров НИР ГБОУ НГМУ
Минздрава России

 Захарова Л.Н.
«21» 01 2016 г.