

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2021 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации прокальцитонина в сыворотке (плазме) крови человека
(Прокальцитонин-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «Прокальцитонин-ИФА-БЕСТ» предназначен для количественного определения концентрации прокальцитонина (ПКт) в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. ПКт является предшественником гормона кальцитонина с молекулярной массой 14,5 кДа (116 аминокислот). В норме их синтез осуществляется в С-клетках щитовидной железы, однако, при генерализации бактериальной инфекции бактериальные экзо- и эндотоксины при участии цитокинов стимулируют синтез ПКт в паренхимальных клетках легких, поджелудочной железы, печени, в макрофагах, моноцитах, др. тканях. Это приводит к значительному повышению ПКт у пациентов с бактериальным сепсисом, особенно при тяжелом сепсисе и/или септическом шоке в течение 6–12 часов после генерализации инфекции. При этом повышения уровня кальцитонина не происходит.

1.3. Определение уровней ПКт в сыворотке и плазме крови рекомендуется для диагностики сепсиса, септического шока и тяжелых бактериальных инфекций; для дифференциального диагноза инфекционной и неинфекционной этиологии лихорадки неясного генеза; для мониторинга состояния больных с сепсисом, шоком; оценки эффективности проводимого лечения; оценки прогноза для данного больного. ПКт также используют для ранней диагностики инфекционных осложнений у хирургических пациентов; пациентов интенсивной терапии; реципиентов после пересадки почки, печени, сердца; пациентов, находящихся на искусственной

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором НИИ СД М.Ю.

*ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ
лаборатории Н.А. Варакиным.*

вентиляции легких; пациентов с иммуносупрессией; пациентов с нейтропенией; пациентов с заболеваниями неясного генеза.

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Специфическими реагентами набора являются моноклональные антитела к прокальцитонину, сорбированные на поверхности лунок разборного планшета; биотинилированные поликлональные антитела к ПКт человека. На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках с иммобилизованными антителами. Имеющийся в образцах ПКт связывается с иммобилизованными антителами. Связавшийся ПКт взаимодействует при инкубации с конъюгатом №1 (биотинилированные поликлональные антитела к ПКт человека). На третьей стадии связавшийся конъюгат № 1 взаимодействует при инкубации с конъюгатом № 2 (стрептавидин с пероксидазой хрена). Количество связавшегося конъюгата №2 определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы хрена – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность желтого окрашивания пропорциональна концентрации ПКт в анализируемом образце.

После измерения оптической плотности (ОП) раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация ПКт в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный с иммобилизованными моноклональными антителами к ПКт, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы, содержащие ПКт (0; 0,05; 0,2; 0,8; 3,2 и 12,8 нг/мл), лиофилизированные – 6 флаконов;
- контрольный образец, содержащий ПКт (концентрация указана на флаконе), лиофилизированный – 1 флакон;
- конъюгат № 1, биотинилированные поликлональные антитела к ПКт, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- конъюгат № 2, стрептавидин – пероксидаза хрена, готовый для использования – 1 флакон, (13 мл);
- раствор для разведения образцов (РРО) – 1 флакон (28 мл);

- раствор для восстановления калибровочных и контрольного образцов (РВО) – 1 флакон (5,0 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 2 флакона (по 28 мл);
- раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс); готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент; готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 3 шт.;
- ванночкой для реагентов – 4 шт.;
- наконечниками для пипеток на 5-200 мкл – 32 шт.;
- трафаретами для построения калибровочного графика – 2 шт.

По согласованию с потребителем дополнительно поставляется:

- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.;

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Наличие гемоглобина, билирубина, триглицерида, альбумина, С-реактивного белка в исследуемых образцах не влияют на результаты анализа. Влияния анти-микробной химиотерапии, вазоактивных лекарственных препаратов, болеутоляющих средств, антикоагулянтов или мочегонных средств на измерение концентрации ПКТ не выявлено.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания ПКТ в одном и том же образце с использованием набора «Прокальцитонин-ИФА-БЕСТ» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации ПКТ в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей ПКТ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0,05 – 12,8 нг/мл и составляет 90-110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации ПКТ предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца 0,2 нг/мл. Процент «открытия» составляет 90-110 %.

3.5. Чувствительность. Минимально определяемая концентрация ПКТ, рассчитанная на основании среднего арифметического значения из десяти измерений оптической плотности «нулевого» калибровочного образца плюс 2σ (среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения), не превышает 0,04 нг/мл.

3.6. Клиническая проверка. Концентрацию ПКт измеряли в сыворотке и плазме крови, взятой у 172 здоровых лиц юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20–50 лет. Содержание ПКт в сыворотке крови здоровых доноров не превышает 0,1 нг/мл.

3.7. Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации прокальцитонина, соответствующие нормальным у обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 26 (Приказ Минздрава № 4н от 06.06.2012 г.).

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 февраля 1991 г. и методических указаниях МУ-287-113-00.

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

- 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;
- термостатируемый шейкер орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при 600-800 об/мин и температуре 37 ± 1 °С;
- 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 от 5 до 350 мкл;
- промывочное устройство для планшетов;
- флаконы стеклянные вместимостью 10-15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мкл;
- 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 (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8°С не более 24 часов при условии отсутствия микробной контаминации или при температуре минус 20°С (и ниже) не более 3 мес. Допускается трехкратное замораживание и оттаивание пробы. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10–15 мин при температуре от 18 до 25°С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

7.1. Перед проведением анализа исследуемые образцы и все компоненты набора, в том числе и запечатанный пакет с планшетом, следует выдержать 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. Использовать в течении 1 часа после установки. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 мес.

7.3. 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 от 30 до 40 °С до полного растворения осадка.

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

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

7.4. Подготовка калибровочных и контрольного образцов.

В каждый флакон с калибровочными и контрольным образцом внести по 0,3 мл раствора для восстановления калибровочных и контрольного образцов. Тщательно перемешать.

Приготовленные калибровочные и контрольный образцы в плотно закрытых флаконах можно хранить при температуре от 2 до 8°С не более 1 мес или при температуре минус 20°С и ниже в течение всего срока годности набора. Допускается шестикратное замораживание и оттаивание образцов.

7.5. Подготовка конъюгата № 1

Конъюгат № 1 готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента.

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

После вскрытия можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.

7.6. Подготовка конъюгата № 2.

Конъюгат № 2 готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента.

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

После вскрытия можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс.

Раствор ТМБ плюс готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ плюс отобрать в стеклянный флакон или в пластиковую ванночку для реагента и поместить в защищенное от света место.

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

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	Конъюгат № 1, мл	Конъюгат № 2, мл	Раствор ТМБ плюс, мл	Промывочный раствор	
				ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл
2	2,0	2,0	2,0	4,0	до 100
3	3,0	3,0	3,0	6,0	до 150
4	4,0	4,0	4,0	8,0	до 200
5	5,0	5,0	5,0	10,0	до 250
6	6,0	6,0	6,0	12,0	до 300
7	7,0	7,0	7,0	14,0	до 350
8	8,0	8,0	8,0	16,0	до 400
9	9,0	9,0	9,0	18,0	до 450
10	10,0	10,0	10,0	20,0	до 500
11	11,0	11,0	11,0	22,0	до 550
12	12,0	12,0	12,0	24,0	до 600

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

7.9. Внести во все лунки по 100 мкл раствора для разведения образцов.

Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 20 мкл каждого калибровочного и контрольного образцов. В остальные лунки внести в дубликатах по 20 мкл анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

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

7.10 Планшет заклеймить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и 700 об/мин.

7.11. По окончании инкубации снять 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 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.

7.12. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата № 1 (см. п. 7.5). Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37 ± 1 °C и 700 об/мин.

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

7.13. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет, как указано в п. 7.11.

7.14. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата № 2 (см п. 7.6.). Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37 ± 1 °C и 700 об/мин.

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

7.15. По окончании третьей инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет, как указано в п. 7.11.

7.16. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (см. 7.7.). Инкубировать в защищённом от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25 °C.

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

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

Для внесения стоп-реагента использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-655 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. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

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

9.3. Если концентрация ПКт в анализируемом образце превышает 12,8 нг/мл, образец следует дополнительно развести раствором для разведения образцов в 20 раз (10 мкл исследуемого образца + 190 мкл раствора для разведения образцов), повторить анализ и полученный результат умножить на 20.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. Дробное использование набора может быть реализовано не позднее одного месяца с момента проведения первого иммуноферментного анализа в пределах срока годности набора.

В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 мес;

- приготовленные калибровочные образцы, контрольный образец можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес или при температуре минус 20°С и ниже в течение всего срока годности набора. Допускается шестикратное замораживание и оттаивание образцов.

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

- конъюгат № 1, конъюгат № 2, раствор ТМБ плюс после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах 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. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации ПКт в контрольном образце.

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

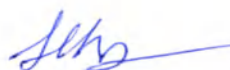
10.6. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах АО «Вектор-Бест».

По вопросам, касающимся качества набора Прокальцитонин-ИФА-БЕСТ, следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 227-67-64, 363-20-60, тел./факс (383) 363-13-46, 363-35-55.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Нач. лаборатории
АО «Вектор-Бест»



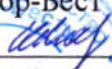
Н.А. Вараксин

Директор НИИ СД
АО «Вектор-Бест»



М.Ю. Рукавишников

Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 10 листов.
Директор по технологии и качеству
АО "Вектор-Бест"


"01"  06 / 2021 г.