

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

июль 2023 г.

м.п.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения концентрации тропонина I в сыворотке (плазме) крови

(Тропонин I-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. «Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации тропонина I в сыворотке (плазме) крови (Тропонин I-ИФА-БЕСТ)» (далее по тексту – набор) предназначен для количественного определения маркера повреждения миокарда – тропонина I в сыворотке, плазме (с Li-гепарином) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) в качестве вспомогательного средства диагностики повреждения миокарда вне зависимости от популяционных и демографических аспектов.

1.2. Набор рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая калибровочные и контрольный образцы. Возможно дробное использование набора (проведение 12 независимых постановок анализа).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на одностадийном «сэндвич» - варианте твердофазного иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител к тропонину I.

В лунках планшета при добавлении исследуемого образца и конъюгата, во время инкубации происходит связывание тропонина I с моноклональными антителами к тропонину I, им-

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, начальником лаборатории ИФА гормонов и опухолевых маркеров С.В. Шеметовым и н.с. лаборатории ИФА гормонов и опухолевых маркеров Д.М. Гришаевым.

мобилизованными на внутренней поверхности лунок, и моноклональными антителами к тропонину I, конъюгированными с пероксидазой хрена. 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 остановки реакции стоп-реагентом результаты ИФА регистрируются измерением оптической плотности (ОП) в лунках планшета.

Концентрацию тропонина I в анализируемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от концентрации тропонина I в калибровочных образцах.

2.2. Состав набора

Компонент набора (сокращение) Описание	Кол-во
Планшет разборный с иммобилизованными моноклональными антителами к тропонину I	1 шт.
Калибровочные образцы* (K1, K2, K3, K4, K5, K6) Содержат известные количества тропонина I - 0; 0,1; 0,5; 2; 6; 12 нг/мл. Содержит фенол (0,06%), ProClin 150 (0,03%), ProClin 950 (0,05%), натрия мертиолят (0,006%).	6 фл., по 2,5 мл
Контрольный образец (КО) Содержит количество тропонина I в пределах, указанных в паспорте и на этикетке флакона, нг/мл. Содержит фенол (0,06%), ProClin 150 (0,03%), ProClin 950 (0,05%), натрия мертиолят (0,006%).	1 фл. 2,5 мл
Конъюгат Конъюгат моноклональных антител к тропонину I с пероксидазой хрена. Содержит ProClin 150 (0,044%), фенол (0,08%)	1 фл. 7,0 мл
Раствор для разведения сывороток (PPC) Содержит ProClin 300 (0,0005%)	1 фл. 12,0 мл
Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твинном (ФСБ-Т×25) Содержит ProClin 300 (0,25%)	1 фл. 28,0 мл
Раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс) Содержит 3,3',5,5' - тетраметилбензидин (0,1%).	1 фл., 13,0 мл
Стоп-реагент Содержит кислоту серную (4,9%).	1 фл., 12,0 мл
Пленка для заклеивания планшета	1 шт.
Наконечники для дозаторов на 2-200 мкл	16 шт.
Ванночки для реагентов	2 шт.
Трафарет для построения калибровочного графика	1 шт.

*Калибровочные образцы аттестованы относительно стандартной панели предприятия.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Линейность в диапазоне концентраций 0,1-12,0 нг/мл тропонина I - в пределах 90%-110%.

3.2. * Воспроизводимость. Коэффициент вариации не превышает 8%.

3.3. *Тест на «открытие» – в пределах 90%-110%.

3.4. * Чувствительность - минимально определяемая набором концентрация тропонина I не превышает 0,02 нг/мл.

3.5 Аналитическая специфичность: перекрестных реакций с изоформами тропонина выявлено не было. При сравнении использовались следующие вещества: тропонин С человека скелетный/сердечный, тропонин Т человека сердечный, тропонин Т человека скелетный в концентрациях 60 нг/мл.

3.6 Потенциально интерферирующие вещества.

Возможные интерференции были определены путем тестирования образцов, в которых содержалось повышенная концентрация предполагаемого материала, который может присутствовать в сыворотке пациента. Гемоглобин в концентрации до 2 мг/мл, билирубин в концентрации до 0,2 мг/мл, триглицериды в концентрации до 20 мг/мл не оказывают интерферирующего влияния.

3.7. Концентрация тропонина I, измеренная в сыворотке крови 326 здоровых лиц в возрасте 20–80 лет с использованием набора «Тропонин I-ИФА-БЕСТ», не превышала 0,1 нг/мл, при этом средняя концентрация составила 0,03 нг/мл.

3.8. Рекомендуются в каждой лаборатории уточнить значения концентрации тропонина I, соответствующие нормальным для данного региона у обследуемого контингента людей и определить значение 99-го перцентиля верхнего уровня референсного диапазона.

* 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. Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом.

4.3. Стоп-реагент и раствор ТМБ плюс обладают раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента и раствора ТМБ плюс на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды. Некоторые компоненты содержат ProClin 150, ProClin 300, ProClin 950, натрия мертиолят, фенол, кислоту серную, тетраметилбензидин в концентрациях, указанных в п. 2.2. «Состав набора».

4.4. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

4.5. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и В, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воз-

духу, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

4.6. Дезинфекцию наборов реагентов, посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми образцами, следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.7. Противопоказания: не применимо, изделие предназначено для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике.

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

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов планшета 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; или автоматический ИФА-анализатор открытого типа (например: анализатор иммуноферментный автоматический «Лазурит» (Lazurite) с принадлежностями РУ № ФСЗ 2009/03660);

– шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ и 400-800 об/мин;

– холодильник бытовой;

– дозаторы одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 10 до 100 мкл.

– дозаторы многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 10 до 300 мкл.

– промывочное устройство для планшетов;

– цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– перчатки медицинские резиновые одноразовые;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Требования к условиям и процедурам ведения преаналитического этапа клинических лабораторных исследований с целью исключения или ограничения влияния эндогенных, экзогенных, ятрогенных и иных факторов, мешающих правильному отражению состояния внутренней среды обследуемых пациентов в результатах клинических лабораторных исследований изложены в ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа».

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», утвержденным Роспотребнадзором и Рекомендациям «Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований», одобренным профильной комиссией Минздрава России по клинической лабораторной диагностике 30.05.2013.

6.2. Для проведения анализа использовать образцы сыворотки, плазмы (с Li-гепарином) крови человека.

6.3. Образцы сыворотки (плазмы) крови следует хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов, или при температуре минус 18 °С и ниже, не более 3 месяцев. После размораживания образцы следует тщательно перемешать. Повторное размораживание и замораживание анализируемых образцов не допускается. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием при 1000-1500 об/мин в течение 5 мин при температуре 18-25°С.

6.5. Образцы с присутствием выраженного гемолиза и коагуляции (наличие сгустков) не подходят для тестирования.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Внимание! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.

Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать при температуре (18-26) °С не менее 30 мин.

– При дробном использовании набора после отбора необходимого количества компонентов флаконы с растворами необходимо плотно закрыть, а оставшиеся стрипы сразу упаковать в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок. Хранить при температуре (2–8) °С, использовать в течение всего срока годности набора.

– Допускается хранение ФСБ-Т×25 и стоп-реагента при температуре (2–30) °С в течение всего срока годности набора.

– Необходимо избегать воздействие прямого солнечного света на раствор ТМБ плюс при подготовке и проведении ИФА.

– 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 в наборах АО «Вектор-Бест».

– Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

– При приготовлении растворов и проведении ИФА следует использовать одноразовые наконечники для дозаторов.

– При использовании автоматического устройства для промывки планшетов необходимо следить за чистотой ёмкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть микробной контаминации. Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно следует выполнить процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой. Один раз в неделю необходимо производить замачивание всей системы промывочного устройства в 70% спирте или в другом растворе, рекомендованном инструкцией к прибору.

– Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих 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 (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

– В случае повторного использования посуду (ванночки) для конъюгата необходимо промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой; посуду (ванночки) для раствора ТМБ плюс ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой. Нельзя обрабатывать посуду (ванночки) дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

– Дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Перемешать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении в концентрате осадка солей прогреть его при температуре (30-40) °С до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т×25 и довести до соответствующего объема дистиллированной водой, тщательно перемешать.

Хранение: при температуре (2-8) ° не более 30 суток или при (18-26) °С не более 7 суток.

7.4. Конъюгат.

Конъюгат готов к использованию. Перемешать содержимое флакона, не допуская вспенивания. В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

7.5. Раствор ТМБ плюс.

Раствор ТМБ плюс готов к использованию. Перемешать содержимое флакона, не допуская вспенивания. В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в ванночку для реагента необходимое количество раствора ТМБ плюс.

Таблица расхода компонентов

Кол-во используемых стрипов	Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл	Промывочный раствор	
			ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл
2	1,0	2,0	4,0	до 100
3	1,5	3,0	6,0	до 150
4	2,0	4,0	8,0	до 200
5	2,5	5,0	10,0	до 250
6	3,0	6,0	12,0	до 300
7	3,5	7,0	14,0	до 350
8	4,0	8,0	16,0	до 400
9	4,5	9,0	18,0	до 450
10	5,0	10,0	20,0	до 500
11	5,5	11,0	22,0	до 550
12	6,0	12,0	24,0	до 600

7.6. Подготовка исследуемых образцов.

Исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при температуре (18-26) °С не менее 30 мин.

7.7. Подготовка калибровочных и контрольных образцов

Калибровочные и контрольные образцы готовы к использованию.

Перед проведением анализа флаконы с калибровочными образцами и контрольным образцом хорошо перемешать встряхиванием.

7.8. Стоп-реагент

Стоп-реагент готов к использованию.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИФА

8.1. В лунки планшета внести по 100 мкл каждого калибровочного образца и 100 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести по 100 мкл анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 20 мин при использовании всех лунок планшета.

Для повышения достоверности результатов допускается исследуемые образцы анализировать в дублях, используя для каждого образца по две лунки.

8.2. Внести во все лунки по 50 мкл конъюгата (см п. 7.4), закрыть стрипы пленкой и инкубировать 60 мин при встряхивании на шейкере с частотой 650 об/мин и температуре (37±1) °С.

Инкубация планшетов в автоматических анализаторах возможна без заклеивания пленкой/закрывания крышкой.

Остатки конъюгата из ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

8.3. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.3), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.4. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (см. п. 7.5) и инкубировать в защищенном от прямого солнечного света месте 15 мин при встряхивании на шейкере с частотой 650 об/мин и температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Остатки раствора ТМБ плюс из ванночки утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором).

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10-15 сек, при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

8.6. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и референсной длине волны в диапазоне 620 - 655 нм. Допускается измерение при одной длине волны – 450 нм. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

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 12 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.

9.4. Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если будут выполнены следующие условия:

– соотношение оптических плотностей калибровочных образцов:

$$\text{ОП}_0 < \text{ОП}_{0,1} < \text{ОП}_{0,5} < \text{ОП}_2 < \text{ОП}_6 < \text{ОП}_{12};$$

- $ОП_{12} \geq 1,0$ ед. опт. плотн. (о.е.);
- $ОП_0 \leq 0,1$ о.е.;
- вычисленное по калибровочному графику значение концентрации тропонина I

в контрольном образце соответствует диапазону концентраций, указанному на этикетке флакона.

$ОП_0$; $ОП_{0,1}$; $ОП_{0,5}$; $ОП_2$; $ОП_6$ и $ОП_{12}$ – средние значения оптической плотности калибровочных образцов 0; 0,1; 0,5; 2; 6 и 12 нг/мл соответственно.

При использовании для расчетов концентраций компьютерного или встроенного в спектрофотометр программного обеспечения в настройках выбрать метод, соответствующий кусочно-линейной аппроксимации.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 26 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя (в том числе после вскрытия флаконов) должно производиться при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

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

10.5. Набор предназначен для однократного применения.

10.6. Изделие нестерильно и не требует стерилизации.

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 «Тропонин I-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 227-67-64, (383) 227-75-41. E-mail: vbobtk@vector-best.ru

КРАТКАЯ СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ИФА ДЛЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «ТРОПОНИН I-ИФА-БЕСТ»

Использовать только после внимательного ознакомления с инструкцией!

Перед началом проведения анализа калибровочные и контрольный образцы, конъюгат необходимо хорошо перемешать встряхиванием.

- Внести:** по 100 мкл калибровочных образцов и контрольного образца;
по 100 мкл анализируемых образцов.
- Внести:** по 50 мкл конъюгата.
- Инкубировать:** 60 мин, 37°C, 650 об/мин.
- Промыть:** промывочным раствором, 350 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл раствора ТМБ плюс.
- Инкубировать:** 15 мин, 37°C, 650 об/мин, в темноте.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

Символ	Описание	Символ	Описание
	Номер по каталогу		Осторожно!
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Код партии		Температурный диапазон
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до....		Обратитесь к инструкции по применению
YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц		

Научный сотрудник лаборатории ИФА гормонов
и опухолевых маркеров НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

Начальник лаборатории ИФА гормонов
и опухолевых маркеров НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

Директор НИИ СД
АО «Вектор-Бест»

«СОГЛАСОВАНО»
Директор «ФИЦ ФТМ»
академик РАН, д.м.н., профессор

 Д.М. Гришаев

 С.В. Шеметов

 М.Ю. Рукавишников

 М.И. Воевода

 26 июня 2023 г.

Всего прошито, пронумеровано и скреплено подписью
и печатью 11 (одинадцать) листов
Директор ФИЦ ФТМ, академик РАН,
д.м.н., профессор М.И. Воевода
« 26 » июля 20 23 г.

