

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

 М.Д. Хусаинов

«30»  2015 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации С-пептида в сыворотке (плазме) крови человека
(С-пептид-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «С-пептид-ИФА-БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для определения концентрации С-пептида в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Измерение концентрации С-пептида используется, в основном, для дифференциальной диагностики сахарного диабета 1-ого и 2-ого типа; для оценки функциональной активности β -клеток поджелудочной железы.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 41 неизвестных образцов, 6 калибровочных образцов, 1 контрольного образца, всего 96 определений при одновременном использовании всех стрипов планшета.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на двухстадийном «сэндвич» варианте твердофазного иммуноферментного анализа. На первой стадии в лунки стрипированного планшета с иммобилизованными моноклональными антителами вносят калибровочные и контрольный образцы с известными концентрациями С-пептида, исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови. На второй стадии связавшийся в лунках С-пептид обрабатывают конъюгатом моноклональных антител к С-пептиду. Образовавшиеся иммунные комплексы «моноклональные антитела – С-пептид – конъюгат антител» определяют с помощью ферментативной реакции.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором НИИ М.Ю. Рукавишниковым и вед. научным сотрудником НИИ СД Т.И. Колочевой.

тела – С-пептид – конъюгат» выявляют ферментативной реакцией с H_2O_2 и раствором тетраметилбензидина. После остановки пероксидазной реакции стоп-реагентом измеряют оптическую плотность растворов в лунках на основной длине волны 450 нм при референсной длине волны 620–650 нм. Допускается измерение только с фильтром 450 нм.

Степень окрашивания пропорциональна концентрации С-пептида в анализируемом образце. Концентрация С-пептида в анализируемых образцах рассчитывается на основании калибровочного графика.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов, «ломающихся» по 1 лунке) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок антителами к С-пептиду, готовые для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы на основе инаktivированной сыворотки крови человека, содержащие известные количества С-пептида – 0; 100; 250; 1000; 2000; 5000 пмоль/л, аттестованные относительно набора реагентов «Mercodia C-peptide ELISA specific» (фирма Mercodia, Швеция РУ № ФСЗ 2010/06182 от 02.02.2010 г.) и контролей маркеров диабета «Mercodia Diabetes Antigen Control (Low, High) / Human» (фирма Mercodia, Швеция); концентрации С-пептида в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 6 флаконов (по 0,7 мл);
- контрольный образец на основе инаktivированной сыворотки крови человека известным содержанием С-пептида, готовый для использования – 1 флакон (0,7 мл);
- конъюгат моноклональных антител к С-пептиду с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБТ×25) – 1 флакон (28 мл);
- раствор для разведения образцов (РРО) – 1 флакон (12 мл);
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент (0,5 М серная кислота), готовый для использования – 1 флакон (10 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 3 шт.;

- трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- ванночкой для реагентов – 2 шт.;
- наконечниками для пипеток на 5 – 200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Специфичность анализа обеспечивается использованием моноклональных антител, обладающих высокой специфичностью к С-пептиду.

3.2. Использование в наборе реагентов специфических блокирующих агентов включает возможность получения ложноположительных результатов в сыворотке (плазме крови, содержащей гетерофильные, в том числе антимишьяновые (НАМА), антитела.

3.3. * Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения концентрации С-пептида в контрольном образце не превышает 8 %.

3.4. * Линейность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «линейность» - отклонение от расчетной величины концентраций С-пептида при разведении калибровочных образцов, содержащих 5000; 2000; 1000 пмоль/л, в 2 раза; калибровочного образца, содержащего 250 пмоль/л, в 2,5 раза. Процент «линейности» составляет 110%.

3.5. * Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» соответствие измеренной концентрации С-пептида, предписанной в образце, полученной тем смешивания равных объемов контрольного образца и калибровочного образца с концентрацией С-пептида 250 пмоль/л. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.6. * Чувствительность. Минимально определяемая концентрация С-пептида, рассчитанная на основании среднего арифметического значения оптической плотности калибровочного образца плюс 2σ (σ - среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения B_0), не превышает 15 пмоль/л.

3.7. «Хук»-эффект высоких концентраций.

«Хук»-эффект отсутствует в диапазоне концентраций С-пептида от 0 до 100000 пмоль/л.

3.8. Клиническая проверка. Концентрация С-пептида, измеренная натощак в сыворотке крови 160 условно здоровых доноров из юго-восточного региона Западной Сибири, в 92% случаев составляет от 100 до 1100 пмоль/л.

3.9. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации С-пептида, соответствующие нормальным у здоровых людей для данного региона.

* по ГОСТ Р 51352-2013.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 г. № 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. 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 контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный йод, перекись водорода и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород, перекись водорода (H₂O₂, деохлор, хлорамин), приводит к серьёзному искажению результатов.

4.8. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

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 - 650 нм;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 20, 50, 100 и 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкости 20, 50, 100 и 300 мкл;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре 37 ± 1 °C и 400-800 об/мин;
- промывочное устройство для планшетов;
- флаконы стеклянные вместимостью 15-30 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 100 мл;
- колбы вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки хирургические;
- бумага фильтровальная лабораторная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для анализа следует использовать образцы сыворотки и плазмы (полученной цитратом натрия в качестве антикоагулянта). Не следует использовать мутную, гемолизированную сыворотку крови, а также сыворотку и плазму, содержащую азид натрия.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 до 8° не более 48 часов или при температуре минус 20°С (и ниже) не более 3 мес.

После размораживания образцы тщательно перемешать, осадок отделить центрифугированием. Тепловая обработка образцов должна быть исключена.

Повторное размораживание и замораживание образцов сыворотки и плазмы крови не допускается!

6.3. Образцы сывороток (плазмы) крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 5000-10000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25 °C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и анализируемые образцы держать при температуре от 18 до 25 °С не менее 60 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 ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в конце теста 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

Калибровочные и контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

Калибровочные и контрольные образцы после первого вскрытия флаконов можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

7.5. Подготовка конъюгата.

Конъюгат готов к использованию.

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

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

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

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

7.6. Подготовка раствора тетраметилбензидина.

Раствор ТМБ готов к использованию.

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

Остатки раствора ТМБ из флакона или ванночки утилизировать (не сливать флакон с исходным раствором ТМБ).

Таблица

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, 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

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

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

Необходимо исключить воздействие света на раствор ТМБ.

7.7. Внести во все лунки по 100 мкл раствора для разведения образцов (РРО).

Внести в соответствующие лунки в дублях по 50 мкл каждого из калибровочных образцов и по 50 мкл контрольного образца. В лунки, предназначенные для анализируемых образцов внести в дублях по 50 мкл исследуемых образцов.

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

7.8. Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в течение 20 мин в термостатированном шейкере при температуре 37±1°С с частотой 700 об/мин.

7.9. 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. 7.3). При этом в каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе одного промывания. Времена 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.

7.10. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см п. 7.5).

Для внесения конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники.

7.11. Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в течение 20 мин в термостатируемом шейкере при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ с частотой 700 об/мин.

7.12. 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 как описано выше (п. 7.9).

7.13. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина (см п. 7.5). Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в термостатируемом шейкере при температуре 37°C в течение 15 мин с частотой 700 об/мин.

Для внесения раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники.

7.14. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как в п. 7.13, раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить оптическую плотность с помощью спектрофотометра в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–650 нм. Если не проводится измерение только с фильтром 450 нм.

Измерение проводить не позднее 10 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- OP_{cp} калибровочного образца 0 пмоль/л не должна быть выше 0,2 ед. опт. плотн.
- OP_{cp} калибровочного образца 5000 пмоль/л должна быть не ниже 1,1 ед. опт. плотн.,

9.2. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ось ординат) от концентрации С-пептида (ось абсцисс) в калибровочных образцах (пмоль/л). Для этого на прилагаемом трафарете для построения графика против концентрации каждого калибровочного образца отложить соответствующее

среднее значение оптической плотности. Последовательно соединить полученные точки отрезками прямых линий.

Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, также рекомендуется определение концентрации С-пептида в контрольных образцах.

9.3. Определить содержание С-пептида в контрольных образцах и анализировать пробы по калибровочному графику.

9.4. Если значение оптической плотности образца превышает значения ОП для калибровочного образца 5000 пмоль/л, то данный образец анализируют повторно после дополнительного разведения раствором для разведения образцов в 10 раз (например, в 10 мкл РРО добавить 10 мкл анализируемого образца), полученные для образцов результаты умножаются на 10.

9.5. Контрольный образец служит для проверки достоверности результатов анализа. Измеренные значения концентрации С-пептида в контрольном образце не должны выходить за пределы интервалов, указанных на этикетке флакона и в паспорте. В этом случае результаты анализа можно считать достоверными.

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

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ 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. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (12 мес). Допускается хранение 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;
- калибровочные образцы, контрольный образец после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

– промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток;

– 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения образцов, раствор ТМБ плюс 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 можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

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

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

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 «С-пептид-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

Вед. научный сотрудник НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

Т.И. Колочева

Директор НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

Зам. директора по научной работе ГБУЗ МО
«Московский областной научно-исследовательский
клинический институт им. М.Ф. Владимирского»
д.м.н., профессор



А.В. Молочков

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 10 листов.
Зав. лабораторией "СПИД" ГБУЗ МО
МОНИКИ И.И.М.Ф. Владимирского
Кудрявцева Е.Н.

