

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

«28» июня 2019 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения

концентрации цистатина С в сыворотке крови

(Цистатин С-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

1.2. Набор рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая калибровочные и контрольный образцы. Возможно дробное использование набора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения цистатина С основан на одностадийном «сэндвич» - варианте твердофазного иммуноферментного анализа с использованием двух моноклональных антител к цистатину С с различной эпитопной специфичностью. В лунки планшета с иммобилизованными моноклональными антителами вносятся калибровочные и контрольный образцы с известными концентрациями цистатина С, исследуемые образцы сыворотки крови и пероксидазный конъюгат антител к цистатину С. Образовавшиеся во время инкубации иммунные комплексы «моноклональные антитела – цистатин С – конъюгат» после отмывки избытка конъюгата выявляют ферментативной реакцией с использованием раствора тетраметилбензидина плюс. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации цистатина С в анализируемых образцах. После остановки реакции добавлением стоп-реагента результаты ИФА регистрируются измерением оптической плотности (ОП) в лунках планшета.

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, зав. лабораторией гормонов и опухолевых маркеров Н.Н. Сорокиной и м.н.с. лаборатории гормонов и опухолевых маркеров В.В. Коренек.

Концентрацию цистатина С в анализируемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания цистатина С в калибровочных образцах.

2.2. Состав набора

Компонент набора (сокращение) <i>Описание</i>	Кол-во
Планшет разборный с иммобилизованными моноклональными антителами к цистатину С	1 шт.
Калибровочные образцы* <i>Содержат известные количества цистатина С – 0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 мкг/мл.</i> <i>Содержат натрия мертиолят (0,02%), ProClin 950 (0,15%).</i>	6 проб., по 200 мкл
Контрольный образец <i>Содержит количество цистатина С в пределах, указанных в паспорте и на этикетке пробирки, мкг/мл.</i> <i>Содержит натрия мертиолят (0,02%), ProClin 950 (0,15%).</i>	1 проб., 200 мкл
Конъюгат <i>Конъюгат моноклональных антител к цистатину С с пероксидазой хрена.</i> <i>Содержит ProClin 150 (0,044%), фенол (0,08%).</i>	1 фл., 13,0 мл
Раствор для разведения сывороток (PPC) <i>Содержит ProClin 300 (0,0005%).</i>	1 фл., 12,0 мл
Раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) <i>Содержит ProClin 300 (0,02%).</i>	1 фл., 10,0 мл
Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) <i>Содержит ProClin 300 (0,25%).</i>	1 фл., 28,0 мл
Раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс) <i>Содержит 3,3',5,5' - тетраметилбензидин (0,1%).</i>	1 фл., 13,0 мл
Стоп-реагент <i>Содержит кислоту серную (4,9%).</i>	1 фл., 12,0 мл
Планшеты разборные для предварительного разведения исследуемых образцов	2 шт.
Пленки для заклеивания планшета	2 шт.
Наконечники для дозаторов на 2-200 мкл	16 шт.
Трафарет для построения калибровочного графика	1 шт.
Ванночки для реагентов	2 шт.

*аттестованы относительно ERM certified Reference Material ERM-DA471/ IFCC.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1.* Воспроизводимость – коэффициент вариации не превышает 8%.

3.2.* Линейность в диапазоне концентраций цистатина С 0,5 – 10,0 мкг/мл – в пределах 90% – 110%.

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

3.4.* Аналитическая чувствительность – минимально определяемая концентрация цистатина С не превышает 0,05 мкг/мл.

3.5. «Хук»-эффект высоких концентраций не был обнаружен вплоть до концентрации цистатина С 250 мкг/мл.

3.6. Концентрация цистатина С, измеренная в сыворотке крови 399 здоровых мужчин и женщин в возрасте 20-50 лет, находилась в пределах от 0,5 мкг/мл до 1,6 мкг/мл.

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации цистатина С, соответствующие нормальным 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. Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом. Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

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, фенол, натрия мертиолят, кислоту серную, тетраметилбензидин в концентрациях, указанных в п. 2.2. «Состав набора».

Все компоненты набора, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

4.4. При работе с исследуемыми и контрольными 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 клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г.

4.5. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение при одной длине волны – 450 нм;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание с частотой 400-800 об/мин и температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- дозаторы одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 10 – 5000 мкл;
- дозаторы многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей 10 – 300 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- дезинфицирующие средства.

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 крови человека.

6.3. Образцы сыворотки крови следует хранить при температуре $(2-8)^\circ\text{C}$ не более 5 суток, или при температуре минус 18°C и ниже, если требуется более длительное хранение. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сыворотки крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. *Внимание! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит из-*

бежать 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 и пробирки 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.

– 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, РПРС, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

– Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

– Для приготовления растворов и проведения 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.

–Запрещается повторное использование планшета разборного для предварительного разведения исследуемых образцов.

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) °С не более 1 месяца или при (18-26) °С не более 7 суток.

Таблица расхода компонентов

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

7.4. Калибровочные и контрольный образцы.

7.4.1. Калибровочные и контрольный образцы развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток (РПРС). Для этого внести в лунки планшета разборного для предварительного разведения исследуемых образцов по 90 мкл РПРС и добавить по 10 мкл калибровочных и контрольного образцов, тщательно перемешать.

7.4.2. Предварительно разведенные в 10 раз калибровочные и контрольный образцы дополнительно развести в 10 раз раствором для разведения сывороток (РРС). Для этого внести в лунки планшета разборного для предварительного разведения исследуемых образцов по 90 мкл РРС и добавить по 10 мкл предварительно разведенных калибровочных и контрольного образ-

цов, тщательно перемешать.

Хранение: не более 3 ч при температуре (18-26) °C.

7.5. Конъюгат.

Конъюгат готов к использованию. В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

7.6. Раствор ТМБ плюс.

Раствор ТМБ плюс готов к использованию. Непосредственно перед внесением и в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать необходимое количество раствора ТМБ плюс в ванночку для реагента.

7.7. Подготовка исследуемых образцов.

7.7.1. Исследуемые образцы развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток (РПРС). Для этого внести в лунки планшета разборного для предварительного разведения исследуемых образцов по 90 мкл РПРС и добавить по 10 мкл цельных образцов сыворотки крови, тщательно перемешать.

При разведении сыворотки красный цвет РПРС должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, анализ образца сыворотки может дать неправильный результат.

7.7.2. Предварительно разведенные в 10 раз исследуемые образцы дополнительно развести в 10 раз раствором для разведения сывороток (РРС). Для этого внести в лунки планшета разборного для предварительного разведения исследуемых образцов по 90 мкл РРС и добавить по 10 мкл предварительно разведенных образцов сыворотки крови, тщательно перемешать.

Хранение: не более 3 ч при температуре (18-26) °C.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внести в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов, по 20 мкл каждого подготовленного калибровочного образца и по 20 мкл подготовленного контрольного образца (см. п. 7.4.). В остальные лунки внести в дублях по 20 мкл подготовленных исследуемых образцов сыворотки крови (см. п. 7.7).

Время внесения образцов не должно превышать 10 мин.

8.2. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см. п. 7.5.), заклеить стрипы пленкой и инкубировать 60 мин при встряхивании на шейкере с частотой 650 об/мин и температуре (37±1) °C.

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 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого цикла промывки. 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. 7.6.) и инкубировать в защищённом 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 длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм. Допускается измерение при одной длине волны - 450 нм. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные, контрольный и анализируемые образцы.

9.2. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации цистатина С в калибровочных образцах (мкг/мл).

9.3. Определить концентрацию цистатина С в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

Если концентрация цистатина С в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 10,0 мкг/мл, образец следует дополнительно развести РРС в 10 раз (10 мкл исследуемого образца + 90 мкл РРС), повторить анализ и полученный результат умножить на 10.

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

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 $(2-8)^\circ\text{C}$. Допускается транспортирование при температуре до 26°C не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при температуре $(2-8)^\circ\text{C}$ в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильни-

ках, 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.

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.

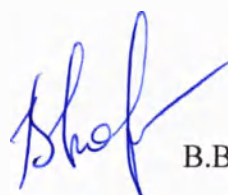
11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления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

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

Россия, 630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 227-67-64, 227-75-41.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

м.н.с. лаборатории гормонов
и опухолевых маркеров НИИ СД
АО «Вектор-Бест»



В.В. Коренек

Зав. лабораторией гормонов
и опухолевых маркеров НИИ СД
АО «Вектор-Бест»



Н.Н. Сорокина

Директор НИИ СД
АО «Вектор-Бест»



М.Ю. Рукавишников

«СОГЛАСОВАНО»
Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России



Т.И. Поспелова





Протиновано, пронумеровано и
скреплено печатью 9 листов.

Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России

Захарова Л.Н

“ 28 ” 06 2019 г.

