

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 200_ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации фактора некроза опухолей-альфа в сыворотке крови
(альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ предназначен для количественного определения концентрации фактора некроза опухолей-альфа (альфа-ФНО) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Альфа-ФНО относится к цитокинам 2-го класса, состоит из длинных вытянутых β -цепей. Молекулярная масса – 17 кД. Альфа-ФНО проявляет избирательную цитотоксичность в отношении некоторых опухолевых клеток; активировывает гранулоциты, макрофаги, эндотелиальные клетки, гепатоциты, остеокласты и хондроциты, активировывает транскрипцию других провоспалительных цитокинов; стимулирует пролиферацию и дифференцировку нейтрофилов, фибробластов, эндотелиальных клеток, Т- и В-лимфоцитов.

1.3. Количественное определение содержания альфа-ФНО в сыворотке крови может иметь важное значение для оценки иммунного статуса организма.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного образца, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки, всего 96 определений при одновременном использовании всех стрипов планшета.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением антител к альфа-ФНО. В лунках, при добавлении исследуемого образца сыворотки крови, во время первой инкубации происходит связывание альфа-ФНО с

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, нач. лаборатории Н.А. Вараксиним.

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 200__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

_____ М.Д. Хусаинов

«__» _____ 2007 г.

М.П.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения концентрации фактора некроза опухолей-альфа в сыворотке крови

(альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ предназначен для количественного определения концентрации фактора некроза опухолей-альфа (альфа-ФНО) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Альфа-ФНО относится к цитокинам 2-го класса, состоит из длинных вытянутых β -цепей. Молекулярная масса – 17 кД. Альфа-ФНО проявляет избирательную цитотоксичность в отношении некоторых опухолевых клеток; активирует гранулоциты, макрофаги, эндотелиальные клетки, гепатоциты, остеокласты и хондроциты, активирует транскрипцию других провоспалительных цитокинов; стимулирует пролиферацию и дифференцировку нейтрофилов, фибробластов, эндотелиальных клеток, Т- и В-лимфоцитов.

1.3. Количественное определение содержания альфа-ФНО в сыворотке крови может иметь важное значение для оценки иммунного статуса организма.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного образца, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки, всего 96 определений при одновременном использовании всех стрипов планшета.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением антител к альфа-ФНО. В лунках, при добавлении исследуемого образца сыворотки крови, во время первой инкубации происходит связывание альфа-ФНО с

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, нач. лаборатории Н.А. Вараксиным.

моноклональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок.

Несвязавшийся материал удаляется отмывкой. Связавшийся альфа-ФНО взаимодействует во время второй инкубации с конъюгатом № 1 (биотинилированные антитела к альфа-ФНО человека). Несвязавшийся конъюгат № 1 удаляется отмывкой. На третьей стадии связавшийся конъюгат № 1 взаимодействует при инкубации с конъюгатом № 2 (стрептавидин-пероксидаза хрена). Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации альфа-ФНО в анализируемых пробах.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация альфа-ФНО в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к альфа-ФНО, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, аттестованные относительно стандарта альфа-ФНО (фирма R & D Systems, Inc., США), содержащие известные количества альфа-ФНО – 0; 5; 15; 40; 100; 250 пг/мл; концентрации альфа-ФНО в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, лиофилизированные – 6 флаконов;
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием альфа-ФНО, лиофилизированная – 1 флакон;
- конъюгат № 1 (биотинилированные антитела к альфа-ФНО), концентрат, лиофилизированный – 1 флакон;
- конъюгат № 2 (стрептавидин-пероксидаза хрена), концентрат, лиофилизированный – 1 флакон;
- раствор для разведения сывороток – 1 флакон (13 мл);
- раствор для разведения конъюгата № 2 – 1 флакон (13 мл);
- промывочный раствор, концентрат – 2 флакона (по 28 мл);
- раствор для разведения тетраметилбензидина – 1 флакон (13 мл);
- тетраметилбензидин, концентрат – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент (1 М серная кислота), готовый для использования – 1 флакон (12 мл);
- пленка для заклеивания планшета – 3 шт.;

- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- ванночка для реагента – 3 шт.;
- наконечники для пипеток на 4-200 мкл – 24 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрёстной реакции используемых в наборе антител к альфа-ФНО с антителами к другим цитокинам.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения альфа-ФНО в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации альфа-ФНО в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей альфа-ФНО, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 5-250 пг/мл и составляет 90-110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации альфа-ФНО предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 15 пг/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация альфа-ФНО не превышает 2 пг/мл.

3.6. Клиническая проверка. Концентрацию альфа-ФНО измеряли в сыворотке крови, взятой у 185 здоровых мужчин и здоровых женщин юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20-50 лет. Уровень альфа-ФНО не превышал 2,5 пг/мл.

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации альфа-ФНО, соответствующие нормальным, у обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б.

4.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента (раствор серной кислоты), являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной

гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных 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.

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;

– шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре $+37 \pm 1$ °C и 600-800 об/мин;

– промывочное устройство для планшетов;

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 50, 100, 250 и 1000 мкл;

– пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкостей до 300 мкл;

– флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;

– цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;

– колба вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– перчатки резиновые или пластиковые;

– бумага фильтровальная лабораторная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови.

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре $+2-8$ °C не более 24 ч

или при температуре минус 20 °С (и ниже) не более 3 мес.

Повторное размораживание образцов сыворотки крови не допускается.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000-1500 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре (+18–25 °С).

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при комнатной температуре в течение времени не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка, установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов и использовать их в течение времени не более 1 ч. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок; хранить при температуре +2–8 °С в течение всего срока годности.

7.3. Приготовление рабочего промывочного раствора

Готовится в мерном цилиндре.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата промывочного раствора и добавить соответствующее количество дистиллированной воды.

В таблице приведён расход реагентов в зависимости от числа используемых стрипов.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре +30–40 °С до полного растворения осадка.

Приготовленный рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре +2–8 °С не более 3 сут.

7.4. Приготовление калибровочных проб и контрольной сыворотки

В каждый флакон с калибровочными пробами и контрольной сывороткой внести по 0,7 мл рабочего промывочного раствора, тщательно перемешать.

Приготовленные калибровочные пробы и контрольную сыворотку после первого использования разлить по 150 мкл и заморозить. Не допускается повторное замораживание! Хранить при температуре минус 20 °С не более 1 мес.

7.5. Приготовление концентратов конъюгата № 1 и конъюгата № 2

Во флаконы с концентратами конъюгата № 1 и конъюгата № 2 внести по 0,7 мл рабочего промывочного раствора, перемешать до полного растворения.

Приготовленные концентраты конъюгатов № 1 и № 2 можно хранить при температуре +2–8 °С не более 1 мес.

7.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата № 1

Готовится в стеклянном флаконе за 5-10 мин до окончания первой инкубации!

Использовать в течение 1 ч после приготовления.

В таблице приведён расход реагентов в зависимости от числа используемых стрипов.

7.7. Приготовление рабочего раствора конъюгата № 2

Готовится в стеклянном флаконе за 5-10 мин до окончания второй инкубации!

Использовать в течение 1 часа после приготовления.

В таблице приведён расход реагентов в зависимости от числа используемых стрипов.

7.8. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина

Готовится в стеклянном флаконе за 5-10 мин до окончания третьей инкубации!

Использовать в течение 3 ч после приготовления.

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

Таблица

Кол-во исполь- зуемых стрипов	Рабочий промывочный раствор		Рабочий раствор конъюгата № 1		Рабочий раствор конъюгата № 2		Рабочий раствор тетраметилбензидина	
	Концентрат промывоч- ного раствора, мл	Дистилли- рованная вода, мл	Концен- трат конъюга- та, № 1, мл	Рабочий промы- вочный раствор, мл	Концентрат конъюгата № 2, мл	Раствор для разведения конъюгата № 2, мл	Концентрат тетраме- тилбензи- дина, мл	Раствор для разведения тетраме- тилбензи- дина, мл
2	4,0	96	0,10	2,0	0,10	2,0	0,14	2,0
3	6,0	144	0,15	3,0	0,15	3,0	0,21	3,0
4	8,0	192	0,20	4,0	0,20	4,0	0,28	4,0
5	10	240	0,25	5,0	0,25	5,0	0,35	5,0
6	12	288	0,30	6,0	0,30	6,0	0,42	6,0
7	14	336	0,35	7,0	0,35	7,0	0,49	7,0
8	16	384	0,40	8,0	0,40	8,0	0,56	8,0
9	18	432	0,45	9,0	0,45	9,0	0,63	9,0
10	20	480	0,50	10,0	0,50	10,0	0,70	10,0
11	22	528	0,55	11,0	0,55	11,0	0,77	11,0
12	24	576	0,60	12,0	0,60	12,0	0,84	12,0

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

7.10. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл каждой калибровочной пробы и по 100 мкл контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 100 мкл анализируемых образцов сыворотки крови.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 15-20 мин.

7.11. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 120 мин при встряхивании на шейкере при температуре $+37\pm 1$ °C и 700 об/мин.

7.12. По окончании инкубации содержимое лунок удалить отсасыванием или декантированием и промыть, добавляя во все лунки по 300 мкл рабочего промывочного раствора (см п. 7.3), с последующим отсасыванием или декантированием. Процесс промывки повторить 5 раз. После промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.13. Во все лунки внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата № 1 (см п. 7.6).

7.14. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре $+37\pm 1$ °C и 700 об/мин.

7.15. По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 5 раз рабочим промывочным раствором так, как это указано в п. 7.12.

7.16. Во все лунки внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата № 2 (см п. 7.7).

7.17. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при встряхивании на шейкере при температуре $+37\pm 1$ °C и 700 об/мин.

7.18. По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 5 раз рабочим промывочным раствором так, как это указано в п. 7.12.

7.19. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (см п. 7.8) и инкубировать в темноте в течение 25-30 мин (в зависимости от степени развития окрашивания) при комнатной температуре ($+18-25$ °C).

7.20. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и рабочий раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента. Встряхнуть планшет; при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 650 нм; или при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху). Измерение проводить через 2-3 мин после остановки реакции.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 20 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации альфа-ФНО в калибровочных пробах (пг/мл).

9.2. Определить содержание альфа-ФНО в контрольной сыворотке и анализируемых пробах по калибровочному графику. В случае дополнительного разведения анализируемых образцов полученную концентрацию альфа-ФНО необходимо умножить на фактор разведения.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности (12 мес). Допускается хранение набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Дробное использование набора может быть реализовано не позднее 1 мес с момента проведения первого иммуноферментного анализа, но в пределах срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;
- приготовленные калибровочные пробы и контрольную сыворотку можно хранить при температуре минус 20°C не более 1 мес. Повторное замораживание не допускается;
- приготовленные концентраты конъюгатов № 1 и № 2 можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 1 мес;
- концентрат тетраметилбензида после вскрытия флакона можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 1 мес;
- концентрат промывочного раствора, растворы для разведения сывороток, тетраметилбензида, конъюгата № 2 и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;
- рабочие растворы конъюгатов № 1 и № 2 можно хранить при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не более 1 ч;
- рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 3 сут;

– рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при комнатной температуре не более 3 ч;

– построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации альфа-ФНО в контрольной сыворотке.

10.3. Если концентрация альфа-ФНО в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 250 пг/мл, образец следует дополнительно развести раствором для разведения сывороток в 20 раз (20 мкл исследуемого образца + 380 мкл раствора для разведения сывороток), повторить анализ и полученный результат умножить на 20.

10.4. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов других фирм-производителей.

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

По вопросам, касающимся качества набора альфа-ФНО-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) 336-60-30, 336-73-46,

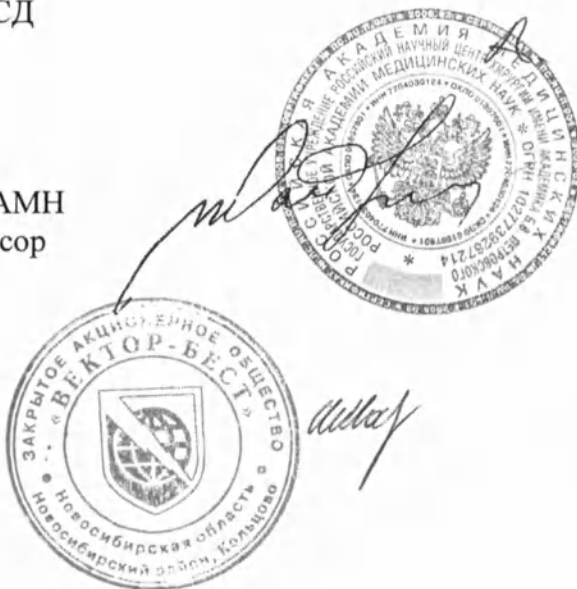
и в **Институт стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора** по адресу:

117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (095) 120-60-95; 120-60-96.

Нач. лаборатории НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

Зам. директора РНЦХ РАМН
чл.-корр. РАМН, профессор

Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»



Н.А. Вараксин

В.А. Сандриков

М.Д. Хусаинов