

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от 19.01 2009 г. № 242-ПГ/09

Копия верна



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2008 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации интерлейкина-6 в сыворотке крови человека
(ИНТЕРЛЕЙКИН-6 – ИФА – БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ИНТЕРЛЕЙКИН-6 – ИФА – БЕСТ предназначен для определения концентрации интерлейкина-6 (ИЛ-6) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Интерлейкин-6 представляет собой гликопротеин с $M = 21-28$ kDa, является плеiotропным цитокином с широким диапазоном биологической активности, ИЛ-6 регулирует иммунный ответ, острофазный ответ, воспаление, онкогенез и гемопоэз. Одной из основных функций ИЛ-6 является регуляция процессов созревания антителопродуцирующих клеток и продукции иммуноглобулинов. ИЛ-6 участвует в активации Т-лимфоцитов, индуцирует синтез многих острофазных белков, может оказывать гормоноподобное действие на печень, поддерживая гомеостаз глюкозы. ИЛ-6 играет ключевую роль в развитии воспаления и иммунного ответа на инфекцию или повреждение тканей. Повышенный уровень ИЛ-6 наблюдается при многих патологических состояниях, таких как артрит и болезнь Кастлемана, гломерулонефрит, псориаз, воспаление кишечника, злокачественные плазмоцитомы, миелома, лимфома, лейкомия, рак яичников; при травмах или обширных хирургических операциях, ишемии, ожогах, ИЛ-6 является одним из главных медиаторов повреждения тканей.

1.3. Количественное определение содержания ИЛ-6 может иметь важное значение для оценки иммунного статуса организма.

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

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного, 6 калибровочных образцов и 1 контрольного образца, 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 моноклональных антител к интерлейкину-6 (ИЛ-6). В лунках, при добавлении исследуемого образца, во время первой инкубации происходит связывание ИЛ-6 с моноклональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок.

Несвязавшийся материал удаляется отмывкой. Связавшийся ИЛ-6 взаимодействует во время второй инкубации с конъюгатом № 1 (биотинилированные антитела к ИЛ-6 человека). Несвязавшийся конъюгат № 1 удаляется отмывкой. На третьей стадии связавшийся конъюгат № 1 взаимодействует при инкубации с конъюгатом № 2 (стрептавидин-пероксидаза хрена). Несвязавшийся конъюгат № 2 удаляется отмывкой. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски пропорциональна концентрации ИЛ-6 в анализируемых образцах.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация ИЛ-6 в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к ИЛ-6, готовый для использования – 1 шт.;

- калибровочные образцы на основе сыворотки крови человека, аттестованные относительно стандарта ИЛ-6 (фирма R&D Systems, Inc., США D6050), содержащие известные количества ИЛ-6 – 0; 5,6; 16,7; 50; 150; 300 пг/мл; концентрации ИЛ-6 в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, лиофилизированные – 6 флаконов;

- контрольный образец на основе сыворотки крови человека с известным содержанием ИЛ-6, лиофилизированный – 1 флакон;

- конъюгат № 1 (биотинилированные антитела к ИЛ-6), концентрат, лиофилизированный – 1 флакон;

- конъюгат № 2 (стрептавидин-пероксидаза хрена), концентрат, лиофилизированный – 1 флакон;

- раствор для разведения сывороток (PPC) – 1 флакон (13 мл);
- раствор для предварительного разведения конъюгата № 2 (РПРК) – 1 флакон (1,0 мл);
- раствор для разведения конъюгата № 2 (РРК 2) – 1 флакон (13 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (25хФСБ-Т) – 1 флакон (28 мл);
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 флакон (13 мл);
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент (0,5 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 ИЛ-6 с другими цитокинами.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения ИЛ-6 в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора ИНТЕРЛЕЙКИН-6 – ИФА – БЕСТ не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации ИЛ-6 в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей ИЛ-6, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 5,6-300 пг/мл и составляет 90-110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации ИЛ-6 предписанной в образце, полученной путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца 16,7 пг/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ИЛ-6 не превышает 0,5 пг/мл.

3.6. Клиническая проверка. Концентрацию ИЛ-6 измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 185 здоровых доноров юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20-50 лет. Уровень ИЛ-6 не превышал 10 пг/мл.

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации ИЛ-6, соответствующие нормальным, у обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

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 набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического 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 ± 1 °С 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 °С 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 температуре 18–25 °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре 18–25 °С в течение времени не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка, установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с осушителем, 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 25×ФСБ-Т и добавить соответствующее количество дистиллированной воды.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества 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 образцов и контрольного образца

В каждый флакон с калибровочными образцами и контрольным образцом внести по 0,7 мл рабочего промывочного раствора, тщательно перемешать.

Приготовленные калибровочные образцы и контрольный образец можно хранить при температуре 2–8 °С не более 1 мес.

7.5. Приготовление концентратов конъюгата № 1 и конъюгата № 2

Во флакон с концентратом конъюгата № 1 внести 0,7 мл рабочего промывочного раствора. Во флакон с концентратом конъюгата № 2 внести 0,7 мл раствора для предварительного разведения конъюгата, 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 из концентрата конъюгата № 1 и рабочего промывочного раствора за 5-10 мин до окончания первой инкубации!

В таблице приведён расход реагентов в зависимости от числа используемых стрипов. Использовать в течение 3 ч после приготовления.

7.7. Приготовление рабочего раствора конъюгата № 2

Готовится в стеклянном флаконе из концентрата конъюгата № 2 и раствора для разведения конъюгата № 2 за 5-10 мин до окончания второй инкубации!

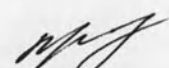
В таблице приведён расход реагентов в зависимости от числа используемых стрипов. Использовать в течение 3 ч после приготовления.

7.8. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина

Готовится в стеклянном флаконе из концентрата тетраметилбензидина и субстратного буферного раствора за 5-10 мин до окончания третьей инкубации!

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

Использовать в течение 3 ч после приготовления.



Таблица

Кол-во исполь- зуемых стрипов	Рабочий промывочный раствор		Рабочий раствор конъюгата № 1		Рабочий раствор конъюгата № 2		Рабочий раствор тетраметилбензидаина	
	25×ФСБ-Т, мл	Дистилли- рованная вода, мл	Концен- трат конъюга- та, № 1, мл	Рабочий промы- вочный раствор, мл	Концентрат конъюгата № 2, мл	РРК 2, мл	Концентрат тетраме- тилбензи- дина, мл	СБР, мл
2	4	96	0,10	2,0	0,10	2,0	0,14	2,0
3	6	144	0,15	3,0	0,15	3,0	0,21	3,0
4	8	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 каждого калибровочного образца и по 100 мкл контрольного образца. 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 ± 1 °C и 700 об/мин.

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

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

Для внесения рабочего раствора конъюгата №1 использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники.

7.14. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37 ± 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).

Для внесения рабочего раствора конъюгата № 2 использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники.

7.17. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37 ± 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 мин при температуре 18–25 °C.

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

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 жёлтый 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 10 мин.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации ИЛ-6 в калибровочных образцах (пг/мл).

9.2. Определить содержание ИЛ-6 в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

9.3. Если концентрация ИЛ-6 в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 300 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. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов ИНТЕРЛЕЙКИН-6 – ИФА – БЕСТ должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2–8 °С в течение всего срока годности (18 мес).

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 °С в течение всего срока годности;

- приготовленные калибровочные образцы и контрольный образец можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре 2–8 °С не более 1 мес;

- приготовленные концентраты конъюгатов № 1 и № 2 можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре 2–8 °С не более 1 мес;

- концентрат тетраметилбензидина после вскрытия флакона можно хранить при температуре 2–8 °С не более 1 мес;

- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения сывороток, растворы для предварительного разведения конъюгата № 2, для разведения конъюгата № 2, субстратный буферный раствор и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре 2–8 °С в течение всего срока годности;

- рабочие растворы конъюгатов № 1 и № 2 можно хранить при температуре 18–25 °С не более 3 ч;

- рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре 2–8 °С не более 3 сут;

- рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при температуре 18–25 °С не более 3 ч;

- построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации ИЛ-6 в контрольном образце.

10.3. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов

(ФСБ-Т×25, СБР, ТМБ, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

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

По вопросам, касающимся качества набора ИНТЕРЛЕЙКИН-6 – ИФА – БЕСТ, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 336-60-60, 227-67-64, 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. (495) 120-60-95; 120-60-96.

Нач. лаборатории НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

Н.А. Вараксин

Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

Генеральный директор
ЗАО «Вымпел-Медцентр»



С.П. Кондрашов



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
десять листов

Handwritten signature