

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

«30» 2014 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации интерлейкина-18 в сыворотке крови человека
(Интерлейкин-18-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов Интерлейкин-18-ИФА-БЕСТ предназначен для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-18 (ИЛ-18) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. ИЛ-18 представляет собой протеин с молекулярной массой 18 кД, относится к семейству интерлейкина 1, является провоспалительным цитокином. Он играет важную роль в иммунных и воспалительных реакциях, и особенно представлен в некоторых аутоиммунных нарушениях.

Повышенные содержания ИЛ-18 наблюдаются при таких заболеваниях, как системная красная волчанка, острая почечная недостаточность, первичный билиарный цирроз печени, нефротический синдром, рак почки, рак мочевого пузыря, перивентрикулярная лейкомоляция, болезнь Крона, рассеянный склероз, туберкулез, язвенная болезнь желудка и пепсис.

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном «сэндвич» варианте иммуноферментного анализа с применением двух типов моноклональных антител с различной эпитопной специфичностью к ИЛ-18.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках с иммобилизованными антителами. Имеющийся в образцах ИЛ-18 связывается с иммобилизованными антителами. На второй стадии связавшийся ИЛ-18 взаимодействует

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

при инкубации с конъюгатом №1 (антитела к ИЛ-18 человека с биотином). На третьей стадии связавшийся конъюгат №1 взаимодействует при инкубации с конъюгатом №2 (стрептавидин с пероксидазой хрена).

Количество связавшегося конъюгата №2 определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы хрена – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность желтого окрашивания пропорциональна концентрации содержащегося в образце ИЛ-18.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к ИЛ-18, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы на основе сыворотки крови, аттестованные относительно стандартов к ИЛ-18 (фирма MBL International, США, кат. № 7620), содержащие известные количества ИЛ-18 – 0; 12,3; 37; 111; 333; 1000 пг/мл; концентрации ИЛ-18 в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов; лиофилизированные – 6 флаконов;
- контрольный образец на основе сыворотки крови с известным содержанием ИЛ-18, лиофилизированный – 1 флакон;
- конъюгат № 1 (биотинилированные моноклональные антитела к ИЛ-18), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- конъюгат № 2 (стрептавидин-пероксидаза хрена), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- раствор для разведения образцов (РРО) – 1 флакон (13 мл);
- раствор для восстановления калибровочных и контрольного образцов (РВО) – 1 флакон (7,0 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 2 флакона (по 28 мл);
- раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 3 шт.;
- трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- ванночкой для реагента – 4 шт.;
- наконечниками для пипеток на 5-200 мкл – 32 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител к ИЛ-4, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10, ИНФ-гамма, ИЛ-8, ИЛ-17, ФНО-альфа, ИНФ-альфа, рецепторному антагонисту ИЛ-1, ИЛ-1бета.

3.2.* Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения ИЛ-18 в контрольном образце не превышает 8%.

3.3.* Линейность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «линейность» - отклонение от расчётной величины концентрации ИЛ-18 при разведении калибровочных образцов, содержащих 1000; 333; 111 и 37 пг/мл ИЛ-18 в 3 раза. Процент «линейности» составляет 90-110%.

3.4.* Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» - соответствие измеренной концентрации ИЛ-18 предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца с концентрацией ИЛ-18 37 пг/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5.* Чувствительность - минимально определяемая концентрация ИЛ-18, рассчитанная на основании среднего арифметического значения оптической плотности калибровочного образца B_0 плюс 2σ (среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения B_0), не превышает 2 пг/мл.

3.6. Клиническая проверка. Концентрация ИЛ-18, измеренная в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 224 условно здоровых мужчин и женщин юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20–50 лет, не превышала 261 пг/мл.

3.7. Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации ИЛ-18, соответствующие нормальным, у обследуемого контингента людей.

* по ГОСТ Р 51352-99

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 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 пораженный участок промыть 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 и в методических указаниях МУ-287-113 («Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998.).

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 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, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному 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 в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре 37 ± 1 °C и 600-800 об/мин;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 20, 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 медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Образцы сыворотки крови человека 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.

6.2. Образцы сывороток крови сильно гемолизированные, сильно липемичные, мутные, содержащие осадок или взвесь эритроцитов, могут давать недостоверные результаты. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать 10–15 минут при 3000 об/мин.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре от 18 до 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 от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление рабочего промывочного раствора.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды.

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

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

Приготовленный рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

7.4. Приготовление калибровочных и контрольного образцов.

В каждый флакон с калибровочными и контрольным образцами внести по 0,70 мл раствора для восстановления калибровочных и контрольного образцов. Тщательно перемешать.

Приготовленные калибровочные и контрольный образцы можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес или при температуре минус 20 °С и ниже в течение всего срока годности набора. Допускается шестикратное замораживание и оттаивание

образцов.

7.5. Подготовка конъюгата № 1

Конъюгат № 1 готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в ванночку для реагента.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов. После вскрытия можно хранить в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

7.6. Подготовка конъюгата № 2

Конъюгат № 2 готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата отобрать в ванночку для реагента.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов. После вскрытия можно хранить в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс (раствора ТМБ плюс).

Раствор ТМБ плюс готов к использованию.

Необходимое количество раствора ТМБ плюс отобрать в ванночку для реагента и поместить в защищенное от света место.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов. Раствор ТМБ плюс после первого вскрытия можно хранить в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

Таблица

Количество используемых стрипов	Рабочий промывочный раствор		Конъюгат № 1	Конъюгат № 2	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т× 25, мл	Дистиллированная вода, мл			
2	4,0	до 100	2,0	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0	4,0
5	10	до 250	5,0	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0	12,0

7.8. Стоп-реагент готов к использованию. После вскрытия можно хранить в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

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

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.

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 снять пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть, добавляя во все лунки по 350 мкл рабочего промывочного раствора (см п. 7.3). Процесс промывки повторить 4 раза. Общее количество отмывок равно 5. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. Затем удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевёрнутом положении по фильтровальной бумаге.

7.13. Во все лунки внести по 100 мкл конъюгата № 1 (см п. 7.5).

Для внесения конъюгата №1 использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

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 конъюгата № 2 (см п. 7.6).

Для внесения конъюгата № 2 использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

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 раствора ТМБ плюс (см п. 7.7). Инкубировать в защищенном от света месте течение 25 мин при температуре от 18 до 25 °C.

Для внесения раствора ТМБ плюс 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 раствор тетраметилбензидина плюс, по 100 мкл стоп-реагента.

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 - 655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху).

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-18 в калибровочных образцах (пг/мл).

9.2. Определить содержание ИЛ-18 в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

9.3. Если концентрация ИЛ-18 в анализируемых образцах превышает 1000 пг/мл, образец следует дополнительно развести раствором для разведения образцов в 20 раз (20 мкл исследуемого образца + 380 мкл раствора для разведения образцов), повторить анализ и полученный результат умножить на 20.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов Интерлейкин-18-ИФА-БЕСТ должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (18 мес). Допускается транспортирование набора при температуре до 25°С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. 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;

- приготовленные калибровочные образцы и контрольный образец можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°С не более 1 мес или при температуре минус 20°С и ниже в течении всего срока годности набора. Допускается шестикратное замораживание и оттаивание образцов;

- конъюгат № 1, конъюгат № 2, раствор ТМБ плюс, 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения образцов, раствор для восстановления калибровочных и контрольного образцов и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

- рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более

– построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации ИЛ-18 в контрольном образце.

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

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

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.

По вопросам, касающимся качества набора «Интерлейкин-18-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

Нач. лаборатории стабилизации НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

Директор НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

Ректор ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ
им. В.И. Разумовского Минздрава
России

В.М. Попков



Стр. 9

Ректор _____ В.М. Попков

