

СДЕНА

«УТВЕРЖДАЮ»

Росздравнадзора
201 г. № _____

Первый заместитель
генерального директора
ФГУП «НПО «Микроген»
И.В. Сакаева
« 21 » 04 2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
"ИФА-овальбумин"

Тест-система иммуноферментная для определения овальбумина

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов "ИФА-овальбумин" предназначен для количественного определения овальбумина в иммунобиологических препаратах, содержащих овальбумин.

ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

1. Принцип действия.

Принцип действия набора реагентов "ИФА-овальбумин" основан на трехступенчатом твердофазном иммуноферментном анализе. Внесение антител к овальбумину в лунки полистиролового планшета приводит к сорбции антител на полимерную поверхность. Избыток антител удаляется промыванием планшета. После внесения исследуемых образцов в лунки планшета, овальбумин (в случае наличия его в образце) связывается с антителами, сорбированными на твердой фазе, образуя комплекс антиген-антитело. Внесение конъюгата антител к овальбумину, меченных пероксидазой хрена) приводит к образованию комплекса антиген-антитело-конъюгат, прикрепленного к поверхности лунок планшета. Избыток конъюгата удаляется промыванием. Для выявления образовавшегося комплекса в лунки добавляется раствор тетраметилбензидина (ТМБ). В результате ферментативной реакции, хромоген переходит в окрашенную форму. Реакция останавливается внесением раствора серной кислоты. Интенсивность окраски измеряется на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Величина оптической плотности зависит от концентрации овальбумина в образце.

2. Состав набора.

Набор реагентов "ИФА-овальбумин" (тест-система иммуноферментная для определения овальбумина) включает следующие реагенты для проведения твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА):

Планшет для сорбции - планшет для иммунологических реакций однократного применения - 96-луночный полистироловый цельный с плоским дном - 1 шт ;

ИГ-ОА - антитела к овальбумину; прозрачная бесцветная жидкость - 50 мкл, 1 микропробирка или 1 флакон;

ПАГ-ОА - положительный контрольный образец (концентрация овальбумина - 100 нг/мл); аморфный порошок белого цвета - 1 ампула;

Конъюгат - антитела к овальбумину, меченные пероксидазой хрена; прозрачная розового цвета жидкость - 50 мкл, 1 микропробирка или 1 флакон ;

Буфер (x4) - карбонатно-бикарбонатный буфер 4-х кратный концентрат; прозрачная жидкость - 3 мл, 1 флакон;

Буфер - фосфатно-солевой буфер, таблетки белого цвета - 5 таблеток, 1 флакон;

- Твин-20 – вязкая светло-желтого цвета жидкость – 0,25 мл, 1 флакон;
- ТМБ – (тетраметилбензидин) – хромоген, прозрачная светло-желтого цвета жидкость – 12,5 мл, 1 флакон;
- БСА – бычий сывороточный альбумин; порошок белого или светло-желтого цвета БСА – 0,25 г, 1 флакон;
- Стоп-реагент – 2 М раствор кислоты серной; прозрачная, бесцветная жидкость – 1 мл, 1 флакон.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфическая активность.
ОП (оптическая плотность) контроля конъюгата должна быть не более 0,15;
ОП КПАГ-ОА в концентрации 4,0 нг/мл должна быть не менее 0,5;
ОП КПАГ-ОА в концентрации 0,5 нг/мл должна превышать ОП контроля конъюгата не менее чем в 2 раза.
Линейность.
В диапазоне калибровочной кривой коэффициент корреляции должен быть не ниже 0,98.
Предел обнаружения (аналитическая чувствительность) - не более 0,5 нг/мл.
Коэффициент вариации - не более 10%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При работе следует использовать резиновые одноразовые перчатки, для розлива жидкостей - пипетки с одноразовыми пластиковыми наконечниками. Оборудование, находившееся в контакте с биологическими образцами и реагентами, следует дезинфицировать до и после работы замачиванием 70 % этилового спирта. Все сточные растворы следует обрабатывать 6 % раствором перекиси водорода в течение 4 ч. Пробы и реагенты человеческого происхождения, биологический и загрязненный материал, следует утилизировать замачиванием в 6 % растворе перекиси водорода на 4 ч или автоклавированием при температуре 120 °С. Все компоненты реактивов, за исключением хромогена и стоп-реагента (раствор серной кислоты) являются биологическими. Входящий в тест-систему стоп-реагент содержит 2 М кислоту серную, и обращаться с ним следует осторожно. 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 пораженный участок большим количеством воды. Следует избегать любого контакта хромогена с кожей и слизистыми.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема; одноразовые пипетки на 0,5-200 мкл и 200-1000 мкл; пробирки; стаканы мерные; промывающее устройство для планшетов; термостат; спектрофотометр типа «Мультисан, «Унискан»; перчатки одноразовые пластиковые; вода очищенная (дистиллированная или деионизованная); растворы для калибровки: 3% раствор хлорамина или 6% раствор перекиси водорода; спирт этиловый; фильтровальная бумага.

6. КАЛИБРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Биологические препараты, содержащие овалбумин.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Подготовка рабочих растворов для ИФА.
ФСБ-Т: 5 таблеток ФСБ растворить в 500 мл воды очищенной. Залить 5 мл полученного раствора в флакон с твин-20, перемешать, перелить содержимое флакона в емкость с ФСБ. Промыть

ср

с твином-20 раствором ФСБ не менее трех раз. Раствор ФСБ-Т хранить в течение рабочего

раствор № 2. ФСБ -Т-БСА: 0,25 г БСА растворить в 50 мл раствора № 1, аккуратно перемешать. Не допускается хранение в течение 24 ч при температуре от 2 до 8 °С.

раствор № 3. КБР: 3 мл КБР(х4) довести до 12 мл водой очищенной и перемешать. Раствор КБР предназначен к использованию в течение рабочего дня.

раствор разведение ИГ-ОА: для сенсibilизации планшета ИГ-ОА разводят раствором № 3 до рабочего разведения, указанного на этикетке пробирки, рабочий раствор готовят непосредственно перед применением, хранение не допускается.

раствор разведение КПАГ-ОА: содержимое ампулы с КПАГ-ОА разводят в 1 мл раствора № 2 (50 нг/мл). Из полученного КПАГ-ОА с использованием раствора № 2 готовят рабочие разведения концентрациями: 4,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25 нг/мл. Для этого берут 5 пробирок: в пробирку № 1 наливают 1,84 мл раствора № 2 и 0,16 мл раствора КПАГ-ОА (50 нг/мл), содержимое пробирки перемешивают (получают раствор КПАГ-ОА с концентрацией 4,0 нг/мл). В остальные 4 пробирки наливают по 1,0 мл раствора № 2. В пробирку № 2 добавляют 1,0 мл раствора из пробирки № 1, перемешивают. Содержимое пробирки № 2 перемешивают и 1,0 мл раствора переносят в пробирку № 3 и т.д. до пробирки № 5 включительно. Растворы готовят непосредственно перед применением, хранение рабочих разведений КПАГ-ОА не допускается.

раствор разведение конъюгата: конъюгат используют в рабочем разведении, указанном на этикетке. Конъюгат разводят раствором № 2 непосредственно перед применением, хранение не допускается.

2. Проведение иммуноферментного анализа.

В лунки планшета для сорбции внести по 0,1 мл раствора ИГ-ОА в рабочем разведении. Планшет закрыть крышкой или полимерной пленкой и инкубировать в термостате при температуре (36-38) °С в течение 1,5 ч. По окончании инкубации содержимое лунок удалить встряхиванием перевернутого планшета, каждую лунку промывают 3 раза раствором № 1 в объеме 0,3 мл и осушают постукиванием планшета по фильтровальной бумаге, сложенной в 4 слоя.

В лунки А-Е 1-3 рядов планшета внести по 0,1 мл рабочих разведений КПАГ-ОА с концентрациями 4,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25 нг/мл (тремякратно каждое разведение КПАГ-ОА - в одну лунку каждого из трех рядов планшета).

В лунки F 1-3 рядов планшета внести по 0,1 мл раствора № 2 (контроль конъюгата - БСА). В лунки G-H 1-3 рядов и A-H 4-12 рядов планшета внести по 0,1 мл рабочих разведений образцов исследуемых препаратов (каждая серия в 2 - 3 лунках одного разведения). В лунки растворить в растворе № 2 в пределах диапазона анализа. Планшет закрыть крышкой и инкубировать при температуре (36-38) °С в течение 1,5 ч.

Содержимое лунок удалить резким встряхиванием перевернутого планшета и каждую лунку промыть раствором № 1 в объеме 0,3 мл 3 раза и осушить постукиванием планшета по фильтровальной бумаге, сложенной в 4 слоя.

Во все лунки планшета внести по 0,1 мл раствора конъюгата в рабочем разведении. Инкубировать при температуре (36-38) °С в течение 1,5 ч. По окончании инкубации содержимое лунок удалить и промыть 3 раза раствором № 1 как описано выше.

Во все лунки планшета внести по 0,1 мл раствора ТМБ и выдержать при комнатной температуре в течение 15 мин. Реакцию остановить внесением в каждую лунку планшета по 0,1 мл реагента.

РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты реакции должны быть учтены не позднее чем через 10 мин после внесения в лунку реагента.

Измерения проводят при длине волны 450 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень ("бланк") осуществляют по воздуху.

Измеряют средние значения оптической плотности КПАГ-ОА при 450 нм (ОП₄₅₀). По средним значениям строят график зависимости оптической плотности от концентрации овальбумина. По оси абсцисс откладывают концентрацию ОА в нг/мл, по оси ординат - ОП₄₅₀.

236 7
концентрацию ОА в исследуемых образцах определяют по прямолинейному участку
овочного графика при условии, что величина ОП₄₅₀ контроля конъюгата должна быть не
1,5, величина ОП₄₅₀ КПАГ-ОА в концентрации 0,5 нг/мл и более должна не менее, чем в
превышать ОП₄₅₀ контроля конъюгата. В случае получения неудовлетворительных
патов хотя бы по одному из показателей - анализ следует повторить.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

транспортирование в соответствии с СП 3.3.2.1248-03, при температуре от 2 до 8 °С.
хивание не допускается.

хранение в упаковке производителя должно производиться в течение всего срока годности
температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

рок годности - 6 мес. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

екламации на специфические и физические свойства тест-системы направлять в адрес
ГИСК им. Л. А Тарасевича Роспотребнадзора: 119002, г.Москва, пер. Сивцев
д. 41 тел. (499) 241-39-22 и в адрес предприятия-изготовителя
«НПО «Микроген» МЗ РФ, 115086, г. Москва, ул. 1-я Дубровская, д. 15, тел. (495) 710-37-87.
производства: 450014, г.Уфа, ул. Новороссийская, д. 105, тел.(347) 229-92-01.

директора
технологии и производству



Н.В. Загидуллин



