

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
От _____ 200__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
ЗАО «БиоХимМаск»
Тамм И.Е.
02 апреля 2008г.



ИНСТРУКЦИЯ

По применению Реагентов для in-vitro диагностики иммунологических заболеваний иммуноферментным методом

1. Назначение

Иммуноферментный анализ (ИФА) – вид иммунохимического анализа, основанный на высоко специфичной иммунологической реакции антигена с соответствующим антителом с образованием иммунного комплекса, для выявления которого используют в качестве метки фермент или фермент-зависимое вещество.

Комплектация ИФА набора

ИФА набор как правило включает все необходимые для анализа реагенты обычно на 96 определений.

Основными реагентами являются:

А. Стандарты

Пять - семь флаконов референсной сыворотки с различными концентрациями

В. Ферментный реагент (конъюгат)

С. 96-луночный микропланшет, упакованный в алюминиевую фольгу с осушителем

Д. Концентрат промывочного буфера

Субстрат, который часто состоит из двух компонентов -

Е. Субстрат А

Флакон, содержащий ТМБ в буфере

Г. Субстрат В

Флакон, содержащий перекись водорода в буфере.

Г. Стоп-раствор

Флакон, содержащий соляную кислоту (1N HCl).

В набор могут дополнительно входить реагенты для разведения образцов, конъюгата.

Сбор и подготовка образцов

Для получения хороших результатов необходимо правильно организовать этап получения и подготовки к анализу образцов сыворотки крови (плазмы, мочи) с учетом суточных и физиологических изменений концентраций аналита. Кроме того, для нестабильных соединений совершенно необходимо соблюдать рекомендуемые температурные условия подготовки проб к анализу. В ряде случаев использование антикоагулянтов может оказывать влияние на результат анализа, о чем имеется указание в инструкции к набору. При нарушении рекомендуемых условий подготовки проб к анализу результаты могут не соответствовать клинической картине.

Для сопоставимого сравнения нормальных значений забор крови необходимо проводить в одно и то же время, обычно утром натощак. Кровь следует собирать в пробирки без добавок или геля-разделителя. При получении сыворотки следует дождаться пока кровь свернется полностью (приблизительно 30 минут); промежуточные продукты процесса свертывания могут привести к ложноположительным результатам. Для отделения сыворотки используйте центрифугу (10 минут при 3000 об/мин или 20 мин при 1500 об/мин). Образцы не должны содержать видимых глазом включений, нитей, агрегатов; такие образцы следует предварительно центрифугировать. К ошибкам может привести повышенное содержание липидов, микробная контаминация, высокий уровень гемолиза.

Образцы могут храниться при 2-8°C в течение времени, указанного в инструкции; обычно для анализа антител это время не более трех суток. Если необходимо более длительное хранение, образцы необходимо заморозить. Чем больше срок хранения образца тем ниже должна быть температура хранения. Следует избегать многократного замораживания и оттаивания. При необходимости многократного использования образца его перед заморозкой нужно разлить по аликвотам в объеме, удобном для использования.

Следует учитывать, что сыворотки и растворы для разведения сывороток могут различаться по плотности и вязкости. Поэтому при приготовлении разведений их следует тщательно перемешать пипетированием, избегая вспенивания.

Подготовка и использование компонентов набора. Режим хранения.

Группой ошибок является неправильная подготовка и использование компонентов набора, а также нарушение режима его хранения.

1. *Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.*

2. *Открытые реагенты стабильны 30-60 дней при хранении от 2 до 8°C в зависимости от типа набора.*

3. *Не смешивайте реагенты из наборов разных серий.*

4. *Перед началом работы все реагенты должны достичь комнатной температуры (18-24°C).* При дробном использовании набора следует сократить до минимума нахождение растворов при комнатной температуре и особенно в открытом виде. Особенно это касается тех случаев, когда объем реагента во флаконе не превышает 0.5 мл. Происходящее при этом испарение жидкости (адсорбция влаги) изменяет его концентрацию, что приводит к искажению результатов анализа.

5. Для растворения лиофилизированных компонентов, а также для приготовления рабочих растворов из концентрированных препаратов, входящих в состав набора, необходимо использовать дистиллированную (или деионизированную) воду со значением pH, близким к нейтральному (не менее 6). В противном случае может наблюдаться падение сигнала и увеличение коэффициента вариации. Дистиллированная вода не должна храниться более 2-3 дней. Воду следует хранить в неметаллических емкостях. Не следует добавлять в дистиллированную воду в качестве консерванта азид натрия, так как он является ингибитором пероксидазы и может повлиять на активность конъюгата при разведении. Если дистиллированная вода хранилась в холодильнике, то перед приготовлением растворов для ИФА ее следует прогреть до комнатной температуры.

Ллиофилизированные компоненты должны быть растворены не менее чем за 10-15 минут до внесения в планшет или их разведения, и раствор тщательно перемешан пипетированием – не менее 10 раз.

6. Перед вскрытием пакета с планшетом его следует выдержать при комнатной температуре примерно 30 минут для предотвращения конденсации влаги на планшете. Если планшет разборный, и используются не все стрипы сразу, то после вскрытия оставшиеся стрипы следует поместить в пакет, который необходимо закрыть. Не следует удалять пакет с влагопоглотителем. Не следует касаться дна лунок – отпечатки пальцев или перчаток могут привести к неправильной регистрации оптической плотности. При использовании стрипов следует работать с обязательной фиксацией стрипов в рамке (держателе).

7. Для приготовления растворов используйте только тщательно вымытую (лучше одноразовую) посуду. Посуда, в которой готовится раствор хромогена, следует вымыть 1М раствором соляной кислоты и тщательно прополоскать дистиллированной или деионизированной водой. Нельзя использовать обычные моющие средства с ПАВ. Они могут исказить результаты анализа. Не используйте одну и ту же посуду для приготовления, хранения или внесения в планшет конъюгата и хромогена.

8. Избегайте контакта растворов конъюгата и хромогена с ионами металлов. Избегайте попадания света на раствор хромогена и конъюгата.

9. Отрицательное влияние на ход реакции может оказать высокое содержание в воздухе помещения хлора (открытые емкости с раствором хлорамина, уборка с хлорсодержащими дезинфектантами), паров щелочей, кислот и альдегидов. После такой уборки необходимо проветрить помещение, где будет проводиться анализ.

10. Рабочие растворы конъюгата и субстрата должны быть приготовлены за 10-15 минут до внесения в планшет в количестве необходимом для анализа.

Постановка реакции

1. Убедитесь, что все необходимые реагенты и образцы достигли комнатной температуры.

2. Составьте схему расположения бланка, стандартов, контролей и образцов.

3. Вносите стандарты, контроли и образцы в соответствующие лунки. Следует убедиться в том, что исследуемый образец или реагент внесен в лунку. Если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов (например, 2 сыворотки внесены в одну лунку), нельзя, удалив сыворотку из этой лунки, вносить в нее новый образец.

4. Каждый из исследуемых образцов следует вносить, используя новый наконечник для одноканальной пипетки. При использовании многоканальной пипетки следует использовать новые наконечники для каждого используемого реагента.

5. Старайтесь расположить штатив с исследуемыми образцами таким образом, чтобы при заборе образцов исключить возможность их случайного попадания в рабочий планшет или растворы реагентов.
6. Обратите внимание на процесс пипетирования при внесении образцов и других реагентов. Избегайте прикосновения наконечника к стенкам или дну лунки.
7. Следите за точностью Вашего пипетирования. Возможные вариации от ячейки к ячейке при раскапывании не должны превышать 2%. Дозаторы должны быть аттестованы на сходимость результатов пипетирования (рекомендуется проводить не реже 1 раза в месяц) особенно в тех случаях, когда объем анализируемой пробы (или другого реагента) не превышает 50 мкл. Лучше работать влажным наконечником, так как при первом заборе образца сухим наконечником, некоторые белковые компоненты могут в нем адсорбироваться. Чтобы свести к минимуму возможные вариации из-за разного времени инкубации, вносите реагенты с одной и той же скоростью, например, если Вы добавили субстрат за 30 секунд, то и останавливающий реакцию раствор надо внести за такое же время. При коротком времени инкубации с сыворотками (30 минут) и при высокой температуре в помещении на конечном результате реакции может сказаться время внесения образцов; при этом контрольные образцы, внесенные до исследуемых, могут давать завышенные результаты.
8. Оптимизируйте промывание и режим работы с микропланшетом. Слишком сильный вакуум может подсушить белковое покрытие в ячейке, инактивировав его, а слишком слабый приведет к тому, что останутся капельки жидкости. Поэтому надо отрегулировать Ваше промывочное устройство. Не оставляйте ячейки сухими между стадиями добавления реагентов. Даже минимальное высушивание ведет к потерям ферментативной активности. Если в ходе работы возникли непредвиденные задержки заполните ячейки промывающим раствором.
9. Рекомендуется, чтобы все сыворотки анализировались в дублях. Разброс между результатами для одного клинического образца более 5% не допускается. С целью снижения стоимости одного исследования в лаборатории с устойчивыми показателями контроля качества допускается проведение анализа стандартов без дублей и расчет результатов по ранее построенной стандартной кривой в течение двух недель при обязательной постановке контролей.
10. Не используйте в качестве инкубатора системы с конвективным нагревом. Планшет должен прогреваться равномерно по всей площади.
11. Одной из причин получения неудовлетворительных результатов при использовании твердофазных наборов является использование шейкеров-инкубаторов, которые не обеспечивают необходимую интенсивность встряхивания. При этом покрытие антителами поверхность лунки не полностью омывается инкубационной смесью и поэтому не принимает участия в иммунохимической реакции. Следствием этого является снижение связывания и ухудшение качества аналитической системы.
12. Температурный режим инкубации также является фактором, оказывающим влияние на протекание иммунохимической реакции в пробирке. Низкая температура в лаборатории (менее 18 °C) приводит к тому же результату, что и плохое встряхивание.
13. Инкубируйте планшеты с субстратом в темноте. Таким образом Вы сможете избежать краевых эффектов на планшете.
14. Регулярно проверяйте точность работы Вашего оборудования. У Вас не будет хороших результатов без качественного оборудования: от микропипеток и наконечников до микропланшетного ридера.
15. Результаты анализа должны иметь должную точность и воспроизводимость, независимо от того, кто из лаборантов выполняет анализ. Рекомендуется, чтобы лаборант работал одновременно не более чем с двумя планшетами. Необходимо наличие постоянно действующей внутрилабораторной системы контроля качества анализов и участие лаборатории в какой-либо системе внешнего контроля качества анализов.

Постановка контрольных материалов

Обязательным условием проведения ИФА является постановка контрольных материалов и калибраторов. Контрольные материалы ставятся в каждой серии опытов.

Контроль качества в медицинской лаборатории – это статистический процесс, используемый для наблюдения и оценки результатов исследования проб пациентов. Статистический процесс требует:

- 1) регулярного исследования контрольных материалов вместе с пробами пациентов;
- 2) сравнения результатов измерения контрольных материалов с рассчитанными статистическими пределами.

Контрольный материал (КМ) – это максимально приближенный к человеческому образец, в идеале изготовленный из крови, мочи или спинномозговой жидкости человека. Он может быть жидким или лиофилизированным и содержать один или более аналитов в известной концентрации. КМ должны анализироваться так же, как пробы пациентов. Контрольный материал обычно содержит

множество различных аналитов. КМ нормального уровня содержит нормальные концентрации определяемого аналита. КМ патологического уровня содержит повышенное или сниженное по сравнению с нормальными пределами количество этого аналита.

Обычно для контроля аналитического процесса необходимо по крайней мере ежедневное проведение анализа КМ нормального и патологического уровня для каждого аналита. В случае если получены результаты, сильно отличающиеся от паспортных, следует проверить еще раз правильность постановки ИФА и, исключив возможность ошибки в проведении анализа и интерпретации полученных результатов, обратиться к производителю тест-систем.

АЛГОРИТМ ВЫПОЛНЕНИЯ АНАЛИЗА

Подготовка к анализу

1. Перед анализом каждый образец должен быть выдержан при комнатной температуре и тщательно перемешан.
2. Установите необходимое количество стрипов в рамку из расчета постановки стандартов, образцов и контролей в дублях плюс одна лунка для бланка. Оставшиеся стрипы верните в пластиковый пакет с осушителем и герметично закройте.
3. В лунку Бланк добавьте в соответствующем шаге протокола 100 мкл субстрата и 100 мкл стоп-реагента.
4. Для предотвращения загрязнения субстратного раствора часть раствора, необходимую для анализа, перенесите в чистый пластиковый сосуд, предварительно вымытый этанолом и затем дистиллированной водой высокой очистки.
5. Промывочный раствор готовится смешиванием концентрата с 450 мл дистиллированной воды.

1. Пипеткой добавьте 25 мкл стандартов, контролей и проб пациентов в соответствующие лунки планшета.
 2. Добавьте 200 мкл конъюгата в каждую лунку.
 3. Инкубируйте в течение 120 минут при 37°C не закрывая планшет.
 4. Используя автоматическую или ручную технику промывки планшета, удалите содержимое всех лунок, промойте три раза промывочным буфером. Удалите остатки жидкости. Для данной процедуры рекомендуется автоматическая моющая система.
 5. Немедленно добавьте 100 мкл раствора субстрата в каждую лунку.
 6. Инкубируйте при комнатной температуре (20-28°C) в течение 15 минут.
- Замечание: избегайте попадания прямого солнечного света на планшет во время инкубации.
7. Добавьте 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку в той же последовательности, что и субстрат.
 8. Осторожно перемешайте планшет, избегая разбрызгивания.
 9. Измерьте величины поглощения содержимого ячеек при 450 нм. Измерение микропланшета должно быть произведено в течение 60 минут после добавления останавливающего раствора.

РАСЧЕТ

Рассчитайте среднее значение оптической плотности стандартов и образцов (A). Вычтите Бланк (A_c) из всех значений.

Пересчитайте результаты по формуле: $B/B_0 \times 100 = (A - A_c / A_0 - A_c) \times 100$,

где A_0 - значение оптической плотности нулевого стандарта.

Используйте значение индекса $B/B_0 \times 100$ для построения кривой в логарифмических координатах на полулогарифмической бумаге и расчета концентрации эстрадиола.

Результаты могут быть рассчитаны автоматически с использованием аппроксимаций - 4-х параметрической, Сплайны, Logit-Log. Если полученная концентрация выше высшего стандарта, разведите образец нулевым стандартом и проанализируйте его повторно. Умножьте результат на фактор разведения.

Возможные причины возникновения проблем при проведении ИФА

Повышенный фон

1. Недостаточная промывка и/или удаление жидкости из ячеек после промывки. Растворы, содержащие биотин или конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена могут повышать фон при недостаточной промывке ячеек.
2. Контаминация раствора субстрата ионами металлов или окисляющими реагентами, обуславливающими голубую окраску субстрата.
3. Загрязнение дозатора, резервуара диспенсера или раствора субстрата конъюгатом стрептавидина с пероксидазой хрена.
4. Неправильное разбавление конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена. Конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена может содержать глицерин, увеличивающий вязкость раствора, что затрудняет его точное дозирование.
5. Хромогенный субстрат находился на свету перед использованием, что вызвало его окрашивание.

Ана

6. Неправильное время и/или температура инкубации.
7. Испарение содержимого ячеек во время инкубации.
8. Неправильное количество ферментного конъюгата или хромогенного субстрата, внесенное в ячейки.

Повышенные оптические плотности образцов/ стандартов

1. Стандарты разбавлены сывороткой, супернатантом культуры или другой неподходящей средой.
2. Неправильное разбавление ферментного конъюгата.
3. Микропланшет был накрыт пленкой во время инкубации с хромогенным субстратом.
4. Превышение времени инкубации.
5. Проведение инкубации при 37°C вместо инкубации при комнатной температуре.
6. Высокая температура в помещении (более 28°C).
7. Контаминация наконечника, резервуара диспенсера или раствора субстрата ферментным конъюгатом.
8. Хромогенный субстрат находился на свету перед использованием.

Отсутствие или слабое развитие окраски

1. Реагенты не достигли комнатной температуры ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) перед началом анализа.
2. Неправильное хранение компонентов набора (например, не при 2-8°C).
3. Проведение инкубации с ферментным конъюгатом при 37°C вместо инкубации при комнатной температуре.
4. Пропущена одна из инкубаций.
5. Стандарты разбавлены сывороткой, супернатантом культуры или другой неподходящей средой.
6. Высыхание ячеек микропланшета в ходе проведения анализа.
7. Использование неподходящего хромогенного субстрата или стоп-раствора.
8. Низкая температура в помещении ($< 22^\circ\text{C}$).
9. Истечение срока годности реагентов.
10. Ячейки микропланшета поцарапаны наконечником дозатора или промывающего устройства.
11. Использование несоответствующей длины волны считывания.
12. Неправильное разбавление ферментного конъюгата.
13. Несоблюдение методики сбора образцов.
14. Определение аналита в матриксе, для которого тест-система не была оптимизирована.

Низкая воспроизводимость

1. Ошибки при внесении стандартов, образцов или на последующих этапах.
2. Ячейки микропланшета были поцарапаны наконечником дозатора или промывающего устройства.
3. Перенос содержимого между ячейками во время инкубации.
4. Внесение неправильного объема реагентов в ячейки.
5. Стандарты разбавлены сывороткой, супернатантом культуры или другой неподходящей средой.
6. Наличие частиц или преципитатов в образцах.
7. Загрязнение дна ячеек микропланшета.
8. Разная температура ячеек у края и в центре микропланшета - «краевой эффект».
9. Неправильная промывка и удаление раствора из ячеек.

Неправильная форма калибровочной кривой

1. Неправильно приготовлен раствор стандарта.
2. Стандарт не был разбавлен разбавителем стандарта или рабочим буфером.
3. Неправильная промывка и удаление раствора из ячеек.
4. Ошибки при внесении стандарта или на последующих шагах.
5. Использование реагентов (лиофилизированный стандарт, микропланшет с антителами и др.) из других наборов или из наборов другого лота.

Ma