

ВЕКТОР



Набор реагентов
для иммуноферментного определения
концентрации альфа-интерферона

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

альфа-Интерферон – ИФА-БЕСТ

НАБОР РЕАГЕНТОВ
A-8758

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения человеческого интерферон-альфа (альфа-ИНФ) в биологических жидкостях человека и культуральных средах.

Интерферон-альфа относится к интерферонам I типа, представляет собой мономерный негликозилированный белок с молекулярной массой 19-26 kDa и длиной 156–166 аминокислот. Практически все типы клеток при стимуляции могут стать продуцентами альфа-ИНФ.

Индукция интерферонов I типа осуществляется практически немедленно после вирусной инфекции; уже через 30–40 минут регистрируются признаки ответа клеточного генома; синтез клетками альфа-ИНФ и секреция его в окружающую среду наблюдаются сразу после завершения стадии индукции. Уже через 2–3 часа в периферической крови обнаруживаются высокие концентрации функционально активного альфа-ИНФ, а через 6–8 часов концентрация альфа-ИНФ достигает максимума. Образование альфа-ИНФ и альфа-ИНФ индуцированная активация НК, ТЦЛ являются врожденной реакцией организма на внедрение вирусов. ИНФ-альфа индуцированный каскад внутриклеточных событий приводит к подавлению репродукции широкого спектра вирусов. Врожденный неспецифический иммунный ответ сдерживает репликацию вирусов на ранней ста-

дии и позволяет в короткие сроки мобилизовать адаптивный иммунный ответ, необходимый для полной элиминации инфекционного агента.

Таким образом, альфа-ИНФ играет ключевую роль в локальной и системной противовирусной защите. Во время острой фазы вирусных инфекций уровень концентрации альфа-ИНФ значительно возрастает и у подавляющего большинства пациентов коррелирует с нарастанием титра вируса. При этом в период конвалесценции концентрация альфа-ИНФ падает до нормального уровня. Однако, при дисбалансе между Th1 и Th2 ответом ингибиторы альфа-ИНФ (преимущественно ИЛ-10) блокируют эффекты интерферонов, что приводит к прогрессивному течению заболевания, усиливает тенденцию к хронизации и рецидивизирующему течению патологического процесса.

Содержание альфа-ИНФ в сыворотках большинства здоровых доноров (80%) не определяется, у остальных – не превышает 5 пг/мл.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Метод определения основан на твердофазном «сэндвич» – варианте иммуноферментного анализа. Специфическими реагентами набора являются моноклональные антитела к альфа-ИНФ, сорбированные на поверхности лунок разборного полистирольного планшета, конъю-

гат моноклональных антител к альфа-ИНФ с пероксидазой хрена и калибровочные образцы, содержащие альфа-ИНФ.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках с иммобилизованными антителами. Имеющийся в образцах альфа-ИНФ связывается с иммобилизованными антителами. Несвязавшийся материал удаляется отмывкой. Связавшийся альфа-ИНФ взаимодействует при инкубации с конъюгатом антител к альфа-ИНФ человека с пероксидазой хрена. Несвязавшийся конъюгат удаляется отмывкой. После второй отмывки количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы хрена – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Реакцию останавливают добавлением стоп-реагента и измеряют оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм. Интенсивность желтого окрашивания пропорциональна количеству содержащегося в образце альфа-ИНФ.

Набор реагентов рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Для исследования небольших партий проб (от 1 исследуемой пробы до 89) предусмотрено проведение 6 независимых постановок ИФА. Комплектуется всеми необходимыми реагентами для проведения ИФА.

Не допускается замена компонентов набора на аналогичные реагенты из наборов разных серий.

Обращайтесь с сыворотками пациентов как с потенциально инфекционно опасными.

Диапазон измеряемых концентраций 0–500 пг/мл.

2.2 СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный с иммобилизованными моноклональными антителами к альфа-ИНФ – 1 шт.;
- калибровочные образцы, лиофилизированные, содержащие альфа-ИНФ – 0, 25, 50, 100, 200 и 500 пг/мл – 6 фл.;
- контрольный образец, содержащий альфа-ИНФ, лиофилизированный (концентрация указана на флаконе) – 1 фл.;
- конъюгат (лиофилизированные моноклональные антитела к альфа-ИНФ, меченные пероксидазой хрена) – 1 фл.;
- раствор для разведения образцов (РРО) – 1 фл., 13 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 фл., 1 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 фл., 13 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 12 мл;
- пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипеток – 16 шт.;
- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.

2.3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител к ИНФ-гамма, ФНО-альфа, рецепторному антагонисту ИЛ-1, ИЛ-1бета, ИЛ-8, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-2, ИЛ-18, ИЛ-4, ИЛ-17.

Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания альфа-ИНФ в одном и том же образце с использованием набора «альфа-Интерферон – ИФА – БЕСТ» не превышает 8%.

Линейность. Отклонение от расчетной величины концентрации альфа-ИНФ в образцах биологических жидкостях человека и культуральных средах при разведении их РРО не превышает 10% в диапазоне концентраций 25–500 пг/мл.

Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» альфа-ИНФ – соответствие измеренной концентрации альфа-ИНФ предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольного образца и калибровочного образца 50 пг/мл. Процент «открытия» составляет 90–110 %.

Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая концентрация альфа-ИНФ, рассчитанная на основании среднего арифметического значения из десяти измерений оптической плотности «нулевого» калибровочного образца, плюс 2σ (среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения), не превышает 5 пг/мл.

Клиническая проверка. Концентрацию альфа-ИНФ измеряли в сыворотке (плазме) крови, взятой с 9 до 11 ч, у 68 здоровых лиц юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20–50 лет. Средняя концентрация альфа-ИНФ составила 0 пг/мл (0–5 пг/мл). Уровни спонтанной и ФГА индуцированной продукции цитокинов клетками цельной крови и в сыворотке условно здоровых доноров приведены в таблице №2.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

3.1. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента, 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 пораженный участок большим количеством проточной воды.*

3.2. 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.).

3.3. 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.

3.4. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

3.5. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

3.6. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , дioxлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм; 620–650 нм;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре 18–25°C и 500–700 об/мин;

- устройство для промывки планшет;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 20, 50, 100, 250 и 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 100, 250 мкл;
- флаконы стеклянные вместимостью 10–15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная лабораторная.

5. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

5.1. В качестве исследуемых образцов использовать сыворотку, плазму крови или другие биологические жидкости, а также культуральные супернатанты. Для анализа требуется 100 мкл образца.

5.2. Для определения концентрации альфа-ИНФ возможно использование образцов как свежеприготовленных, так и хранившихся не более 3 мес. при температуре не выше минус 16°C. Допускается хранение до 1 года при температуре не выше минус 40°C. Избегайте повторных циклов заморозки и оттаивания.

5.3. Образцы сывороток и плазмы сильно гемолизированные, сильно липемичные или мутные могут давать недостоверные результаты. Такие

образцы перед использованием следует центрифугировать 10–15 минут при 3000 об/мин.

5.4. Перед постановкой анализа исследуемые образцы должны быть извлечены из холодильника и прогреты при температуре 18–25°C в течение 30 мин. Замороженные образцы должны быть быстро разморожены и обязательно тщательно перемешаны до однородной консистенции.

5.5. Образцы сывороток крови, содержащие осадок или взвесь эритроцитов, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать 10–15 минут при 3000 об/мин.

5.6. От соблюдения этих требований зависит точность и воспроизводимость результатов анализа.

6. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

6.1. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ НАБОРА

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты набора, в том числе и запечатанный пакет с планшетом, при температуре от 18 до 25°C не менее 30 мин.

6.2. ПРАВИЛА РАБОТЫ

ПРИ ДРОБНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА

6.2.1. Растворы из флаконов отбирать только одноразовыми индивидуальными наконечниками для пипеток.

Таблица №1

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Количество одновременно используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор ТМБ		Раствор 1	
	Конъюгат мкл	Раствор 1 мл	ТМБ мкл	СБР мл	25×ФСБ-Т мл	Дистил. вода мл
1	50	1,0	70	1,0	2,0	48
2	100	2,0	140	2,0	4,0	96
3	150	3,0	210	3,0	6,0	144
4	200	4,0	280	4,0	8,0	192
5	250	5,0	350	5,0	10,0	240
6	300	6,0	420	6,0	12,0	288
7	350	7,0	490	7,0	14,0	336
8	400	8,0	560	8,0	16,0	384
9	450	9,0	630	9,0	18,0	432
10	500	10,0	700	10,0	20,0	480
11	550	11,0	770	11,0	22,0	528
12	600	12,0	840	12,0	24,0	576

6.2.2. После первого вскрытия и отбора части содержимого флаконы сразу плотно закрыть, поместить в холодильник и хранить при 2–8°С в течение 4 недель, но в пределах срока годности набора.

6.3. ПОДГОТОВКА СТРИПОВ

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа ко-

личество стрипов. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и поместить в холодильник.

Хранение: при температуре от 2 до 8°C в течение 4 недель.

6.4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА 1

Количество концентрата ФСБ-Т и дистиллированной воды для приготовления раствора 1, в зависимости от числа стрипов, приведено в таблице № 1. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при 30–40°C до полного растворения осадка.

Хранение: при 2–8°C в течение 5 суток.

6.5. ПОДГОТОВКА КАЛИБРОВОЧНЫХ И КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦОВ, КОНЦЕНТРАТА КОНЪЮГАТА

Калибровочные и контрольный образцы, конъюгат восстановить в 0,7 мл раствора 1 (п. 6.4.). Выдержать до полного растворения содержимого, тщательно перемешивая.

Хранение: при 2–8°C в течение 4 недель.

6.6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА КОНЪЮГАТА

Готовить за 10–15 минут до окончания первой инкубации!

При проведении реакции на 1 стрипе в чистый флакон внести 1,0 мл раствора 1 (п. 6.4.),

добавить 50 мкл концентрата конъюгата, тщательно перемешать (см. таблицу №1).

Хранение: при 18–25 °С не более 3 часов.

6.7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА ТМБ

Внимание! Рекомендуется выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с тетраметилбензидином. Посуду и наконечники для пипетки, контактирующие с раствором ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду и наконечники ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу № 1) в отдельный чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество СБР, добавить соответствующее количество концентрата ТМБ, тщательно перемешать.

Хранение: не более 3 часов при 18–25°С в темноте.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

7.1. ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

Приготовить раствор 1 (п. 6.4.), калибровочные и контрольный образцы (п. 6.5.), концентрированный раствор конъюгата (п. 6.5.).

Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся – сразу упаковать (п. 6.3.).

Внимание! *Обязательно соблюдайте требования для подготовки исследуемых образцов (п. 5.).*

7.2. ВНЕСЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНЫХ, КОНТРОЛЬНОГО И АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ, ИНКУБАЦИЯ

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

В лунки А-1, В-1, С-1, D-1, Е-1, F-1, G-1 внести по 100 мкл калибровочных и контрольного образцов, в остальные – по 100 мкл исследуемых проб. Отрезать лишнюю пленку требуемого размера.

Стрипы закрыть, плотно прижав пленку, поместить в шейкер. Инкубировать 120 мин при температуре 18–25°C при 700 об/мин.

По окончании инкубации снять лишнюю пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть лунки планшета 5 раз раствором 1 (п. 6.4.). При этом в каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить,

постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

Внимание! *Плохая промывка может привести к недостоверным результатам!*

За 10 мин до окончания инкубации приготовить рабочий раствор конъюгата (п. 6.6.).

7.3. ВНЕСЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА КОНЪЮГАТА, ИНКУБАЦИЯ

Внимание! *Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.*

В каждую лунку стрипов внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.

Стрипы закрыть пленкой, поместить в шейкер. Инкубировать 60 мин при температуре 18–25°C, предпочтительно при 700 об/мин.

За 10 мин до окончания инкубации приготовить раствор ТМБ (п. 6.7.).

7.4. ОТМЫВКА ОТ КОНЪЮГАТА

По окончании инкубации лунки стрипов промывают 5 раз как описано в п. 7.2.

7.5. ВНЕСЕНИЕ РАСТВОРА ТМБ, ИНКУБАЦИЯ

Внимание! *Для внесения раствора ТМБ использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.*

Внести в каждую лунку по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать в темноте в течение 25 мин при температуре 18–25°C.

7.6. ОСТАНОВКА РЕАКЦИИ

Реакцию остановить добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента.

Внимание! *Следует избегать попадания стоп-реагента на открытые участки тела и одежду. При попадании – промыть большим количеством воды.*

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрируют с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–650 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Для определения концентрации альфа-ИНФ в исследуемых пробах необходимо построить калибровочную кривую (график) в координатах: ось абсцисс – концентрация альфа-ИНФ (пг/мл); ось ординат – значение оптической плотности образца.

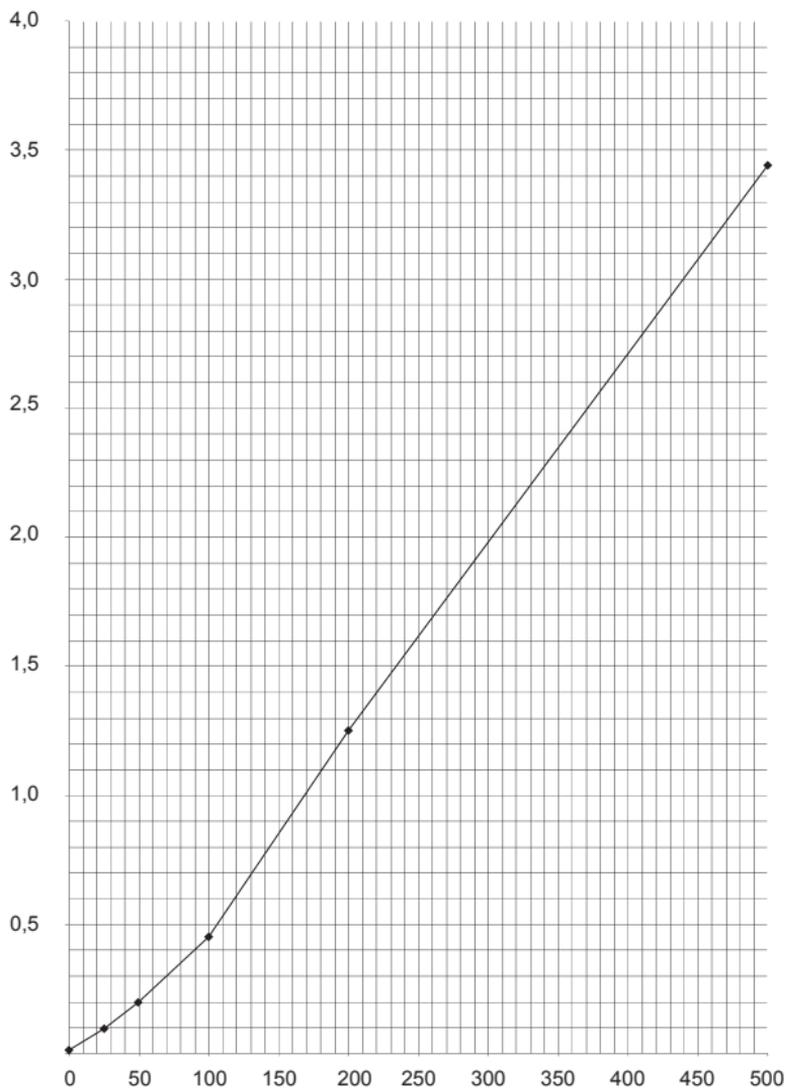
Для этого значение оптической плотности, соответствующее концентрации альфа-ИНФ в каждом калибровочном образце, откладывают на миллиметровой бумаге или прилагаемом трафарете. По полученным точкам проводят калибровочную кривую.

Для определения концентрации альфа-ИНФ в анализируемых пробах на оси ординат отмечают значение оптической плотности анализируемого образца. Проводят прямую до пересечения с калибровочной кривой, от полученной точки пересечения опускают перпендикуляр на ось абсцисс. Точка пересечения и является искомым значением концентрации альфа-ИНФ.

Образцы с содержанием альфа-ИНФ в пробе, превышающем 500 пг/мл, следует развести в 20 раз раствором для разведения образцов и повторить анализ еще раз.

Контрольный образец служит для проверки точности и достоверности результатов. Если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации альфа-ИНФ в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке, значит, полученные величины концентраций альфа-ИНФ в образцах считают достоверными. Концентрации альфа-ИНФ в сыворотках здоровых доноров не превышают 5 пг/мл.

Пример калибровочной кривой представлен на рисунке.



Рисунок

Уровни спонтанной и ФГА индуцированной продукции цитокинов клетками цельной крови и в сыворотке условно здоровых доноров (n = 68).

цитокины	спонтанная		ФГА индуцированная		сыворотки	
	Среднее пг/мл	Диапазон пг/мл	Среднее пг/мл	Диапазон пг/мл	Среднее пг/мл	Диапазон пг/мл
ИНФ- α	1	0-6	3	0-13	0	0-5
ИЛ-4	0	0-2	1	0-6	0	0-13
ИНФ- γ	4	0-14	1200	165-7450	2	0-10
ИЛ-1 β	50	0-107	440	50-1200	1,6	0-11
ИЛ-1РА	450	20-1740	1700	67-7450	520	50-1000
ИЛ-18	50	23-115	50	12-120	370	104-650
ИЛ-6	12	0-90	8500	100-30700	2	0-10
ФНО- α	5	1-42	1150	391-2700	0,5	0-6
ИЛ-8	2200	24-4380	16900	550-82000	2	0-10
ИЛ-10	6	0-50	40	7-130	5	0-31
ИЛ-2	0,3	0-10	155	25-590	0	0-10

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации альфа-ИНФ в биологических жидкостях человека, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов «альфа-Интерферон – ИФА – БЕСТ» следует хранить и транспортировать в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2–8°C. Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 суток. Не допускать замораживания.

Срок годности – 18 месяцев со дня выпуска.

10.2. Дробное использование набора может быть реализовано не позднее 4 недель с момента проведения первого иммуноферментного анализа, но в пределах срока годности. В случае дробного использования набора построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации альфа-ИНФ в контрольном образце.

10.3. Не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями.

10.4. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кро-

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

10.5. *Запрещается использовать компоненты из наборов других серий или других фирм-производителей.*

10.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

**По вопросам, касающимся качества наборов,
обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:**

630559, Новосибирская обл.,
Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46,
тел./факс (383) 332-67-49,
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

30.11.09.

**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

Федеральная лицензия № 99-04-000086
на производство, хранение и реализацию
лекарственных средств

**КРУПНЕЙШИЙ В РОССИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ
ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ
ДИАГНОСТИКУМОВ**

Вирусные гепатиты А, В, С, D
Инфекции, передаваемые
половым путем
ВИЧ-инфекция
TORCH-инфекции
Клещевой энцефалит
Паразитарные болезни
Диагностика беременности
Лабораторное оборудование

***Стабильное качество
и точный результат
для Вашей лаборатории!***

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492
Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)
Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52
E-mail: vbmarket@vector-best.ru
Internet: www.vector-best.ru