«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«26» 05 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения концентрации гамма-интерферона в сыворотке крови (гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации гамма-интерферона в сыворотке крови «гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для определения концентрации гамма-интерферона (гамма-ИНФ) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Гамма-интерферон - интерферон II типа, представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 16,9 kDa, обладает противовирусной и тумороцидной активностью, активирует макрофаги и моноциты, NK-клетки, пролиферацию и дифференцировку цитотоксических Т-лимфоцитов, стимулирует созревание костномозговых клеток – предшественников моноцитов, подавляет опухолевый рост и размножение вирусов.

1.3. Количественное определение содержания гамма-ИНФ в сыворотке крови может быть использовано для диагностики и мониторинга терапии ряда заболеваний, в том числе таких заболеваний как диабет, пневмония, сепсис.

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на трехстадийном «сэндвич» – варианте твердофазного иммуноферментного анализа с использованием моно- и поликлональных антител к гамма-ИНФ человека.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках с иммобилизованными моноклональными антителами. Имеющийся в образцах гамма-ИНФ связывается с иммобилизованными антителами. Связавшийся гамма-ИНФ на второй стадии взаимодействует при инкубации с конъюгатом № 1 (биотинилированные поликлональные антитела к гамма-ИНФ человека). На третьей стадии связавшийся конъюгат № 1 взаимодействует при инкубации с

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 гамма-ИНФ.

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

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

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

– калибровочные образцы, содержащие известные количества гамма-ИНФ – 0; 20; 40; 200; 500 и 1000 пг/мл, аттестованные относительно стандарта гамма-интерферона (фирма Bender MedSystems, Австрия, кат. № BMS 228); концентрации гамма-ИНФ в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, лиофилизированные – 6 флаконов;

– контрольный образец на основе инактивированной сыворотки крови человека с известным содержанием гамма-ИНФ, аттестованный относительно стандарта гамма-интерферона (фирма Bender MedSystems, Австрия, кат. № BMS 228); лиофилизированный – 1 флакон;

– конъюгат № 1 (биотинилированные поликлональные антитела к гамма-ИНФ), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);

– конъюгат № 2 (стрептавидин-пероксидаза хрена), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);

– раствор для восстановления калибровочных и контрольного образцов (РВО) – 1 флакон (7,0 мл);

– раствор для разведения образцов (РРО) – 1 флакон (13 мл);

– 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).

Принадлежности:

– пленка для заклеивания планшета – 3 шт.;

– трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;

– ванночка для реагента – 4 шт.;

– наконечники для дозатора на 2-200 мкл – 32 шт.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител к гамма-ИНФ со следующими цитокинами: ИЛ-1бета, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-8, ИЛ-18, альфа-ФНО, альфа-ИНФ.

3.2.* Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения концентрации гамма-ИНФ в лунках, содержащих контрольный образец, не превышает 8%.

3.3.* Линейность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «линейность» – отклонение от расчётной величины концентрации гамма-ИНФ при разведении калибровочных образцов, содержащих 1000, 500, 200 и 40 пг/мл, в 2 раза. Процент «линейности» составляет 90-110%.

3.4.* Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации гамма-ИНФ предписанной в образце, полученной путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца 40 пг/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5.* Чувствительность. Минимально определяемая концентрация гамма-ИНФ рассчитанная на основании среднего арифметического значения из десяти измерений оптической плотности калибровочного образца B_0 плюс 2σ (σ – среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения), не превышает 2,0 пг/мл.

3.6. Клиническая проверка. Концентрацию гамма-ИНФ, измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч у 120 условно здоровых мужчин и женщин в возрасте 20-50 лет. Уровень гамма-ИНФ не превышал 20 пг/мл.

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

* по ГОСТ Р 51352-2013.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (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 промыть поражённый участок 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 клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г. и в методических указаниях МУ 287-113

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

«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 инфицированные, 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. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) 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 растворов в лунках планшета 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 °С и 600-800 об/мин;

– промывочное устройство для планшетов;

– таймер;

– холодильник бытовой;

– дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 5000 мкл;

– дозатор полуавтоматический многоканальный со сменными наконечниками, позволяющий отбирать объёмы жидкостей от 5 до 350 мкл;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– перчатки медицинские диагностические одноразовые;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа использовать сыворотку крови.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови.

6.3. Для проведения анализа возможно использование образцов сыворотки крови как свежеприготовленных, так и хранившихся при температуре минус 20 °С (и ниже) не более 3 месяцев или до 12 месяцев при температуре не выше минус 40 °С. Повторное размораживание и замораживание образцов сыворотки крови не допускается. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10-15 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сывороток 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.

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) и добавить соответствующее количество дистиллированной воды.

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

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

Хранение: при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

7.4. Приготовление калибровочных образцов и контрольного образца.

В каждый флакон с калибровочными образцами и контрольным образцом внести по 0,7 мл раствора для восстановления калибровочных и контрольного образцов (РВО). Выдержать при температуре от 18 до 25 °С в течение 10 мин. Тщательно перемешать, избегая образования пены.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Хранение: в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С не более 1 месяца; при температуре минус 20 °С и ниже – в течение всего срока годности набора. Допускается шестикратное замораживание и размораживание образцов. После размораживания образцы тщательно перемешать, избегая образования пены.

7.5. Подготовка конъюгата № 1.

Конъюгат № 1 готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата № 1 отобрать в ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА конъюгат № 1 утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

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

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.6. Подготовка конъюгата № 2.

Конъюгат № 2 готов к использованию.

Необходимое количество конъюгата № 2 отобрать в ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА конъюгат № 2 утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом).

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

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

Таблица

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат № 1, мл	Конъюгат № 2, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, концентрат, 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	10,0	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

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс.

Раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс) готов к использованию.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Необходимое количество раствора ТМБ плюс отобрать в ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА раствор ТМБ плюс утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ плюс).

Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидина плюс.

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

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

Внимание! Для работы с раствором ТМБ необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому окислению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внести во все лунки по 100 мкл раствора для разведения образцов (РРО).

8.2. Внести в соответствующие лунки в дублях по 100 мкл каждого калибровочного образца и по 100 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 100 мкл анализируемых образцов сывороток крови.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 15 мин.

8.3. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 120 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37±1 °С и 700 об/мин.

8.4. По окончании инкубации снять пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (см п. 7.3), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить 350 мкл промывочного раствора в процессе промывки каждого стрипа. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. По окончании промывки удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата № 1.

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.6. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37±1 °С и 700 об/мин.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.7. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 5 раз, как указано в п. 8.4.

8.8. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата № 2.

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.9. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37±1 °С и 700 об/мин.

8.10. По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 5 раз промывочным раствором так, как это указано в п. 8.4.

8.11. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина плюс (см п. 7.7) и инкубировать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25 °С.

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

8.12. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина плюс, по 100 мкл стоп-реагента; при этом содержимое лунок окрашивается в жёлтый цвет.

8.13. 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.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные, контрольный и анализируемые образцы.

9.2. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации гамма-ИНФ в калибровочных образцах (пг/мл).

9.3. Определить концентрацию гамма-ИНФ в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

9.4. Если концентрация гамма-ИНФ 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.

9.5. Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации гамма-ИНФ в контрольном образце соответствует указанному

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

диапазону концентраций на этикетке флакона.

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации гамма-ИНФ в сыворотке крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора – 18 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. 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 набора;

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

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

– промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

10.5. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации гамма-ИНФ в контрольном образце.

10.6. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (раствор ТМБ плюс, ФСБ-Т×25, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru