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

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения концентрации фактора некроза опухолей-альфа в сыворотке крови (альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации фактора некроза опухолей-альфа в сыворотке крови «альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для определения концентрации фактора некроза опухолей-альфа (альфа-ФНО) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Фактор некроза опухолей-альфа (альфа-ФНО) является провоспалительным цитокином и стимулирует в других клетках продукцию ИЛ-1 и ИЛ-6, адгезию, индукцию апоптоза, антителообразование В-клетками, продукцию колониеобразующих факторов эндотелиальными клетками и фибробластами, которые участвуют в процессе ангиогенеза обладает общим цитотоксическим действием.

1.3. Количественное определение содержания альфа-ФНО в сыворотке крови может быть использовано для диагностики и мониторинга терапии ряда заболеваний, в том числе таких заболеваний как бактериальная пневмония, гепатиты, сепсис, паразитарные

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 «сэндвич»- варианте твердофазного иммуноферментного анализа с применением моно- и поликлональных антител к альфа-ФНО.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках с иммобилизованными моноклональными антителами. Имеющийся в образцах альфа-ФНО связывается с иммобилизованными антителами. Связавшийся альфа-ФНО на второй стадии взаимодействует при инкубации с конъюгатом № 1 (поликлональные антитела к альфа-ФНО 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

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

субстрата пероксидазы хрена – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность желтого окрашивания пропорциональна концентрации содержащегося в образце альфа-ФНО.

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

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

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

– калибровочные образцы, содержащие известные количества альфа-ФНО – 0; 5; 15; 40; 100; 250 пг/мл; аттестованные относительно WHO International Standard TUMOUR NECROSIS FACTOR ALPHA NIBSC code: 88/786; концентрации альфа-ФНО 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 альфа-ФНО, аттестованный относительно WHO International Standard TUMOUR NECROSIS FACTOR ALPHA NIBSC code: 88/786; лиофилизированный – 1 флакон;

– конъюгат № 1 (биотинилированные поликлональные антитела к альфа-ФНО), 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 используемых в наборе антител к альфа-ФНО со следующими цитокинами: ИЛ-1бета, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-18, гамма-ИНФ, альфа-ИНФ.

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

3.3.* Линейность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «линейность» – отклонение от расчётной величины концентрации альфа-ФНО при разведении калибровочных образцов, содержащих 250; 100; 40 пг/мл, в 2 раза и калибровочного образца, содержащего 15 пг/мл, в 3 раза. Процент «линейности» составляет 90-110%.

3.4.* Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации альфа-ФНО предписанной в образце, полученной путём смешивания равных объёмов контрольного образца и калибровочного образца 15 пг/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5.* Чувствительность. Минимально определяемая концентрация альфа-ФНО, 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 1,0 пг/мл.

3.6. Клиническая проверка. Концентрацию альфа-ФНО измеряли в сыворотке крови, взятой у 185 здоровых мужчин и женщин в возрасте 20-50 лет. Уровень альфа-ФНО не превышал 6 пг/мл.

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации альфа-ФНО, 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 реагентов 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 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.

Необходимое количество раствора ТМБ плюс отобрать в ванночку для реагента.

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

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 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 рабочим промывочным раствором так, как это указано в п. 8.4.

8.11. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина плюс 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 среднее арифметическое значение 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 альфа-ФНО в калибровочных образцах (пг/мл).

9.3. Определить концентрацию альфа-ФНО в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

9.4. Если концентрация альфа-ФНО в анализируемых образцах превышает 250 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 альфа-ФНО 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 альфа-ФНО 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 хранить в плотно закрытых флаконах 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 альфа-ФНО в контрольном образце.

10.6. Для представления результатов измерений концентрации альфа-ФНО в МЕ/мл, следует использовать коэффициент пересчета 0,05 (альфа-ФНО (МЕ/мл) = 0,05 альфа-ФНО (пг/мл)).

10.7. 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».

10.8. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по

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

применению набора.

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 «альфа-ФНО-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