«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«13» _____ 2022 г.
м.п.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
для иммуноферментного определения концентрации альфа-интерферона
в сыворотке крови
(альфа-ИНТЕРФЕРОН-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов альфа-ИНТЕРФЕРОН-ИФА-БЕСТ предназначен для количественного определения концентрации альфа-интерферона (альфа-ИНФ) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Альфа-интерферон относится к интерферонам 1-го типа, представляет собой мономерный негликолизированный белок длиной 165–166 ами-нокислот. Альфа-интерферон является важным медиатором межклеточных взаимодействий. Этот цитокин обладает иммуномоду-лирующим, противовирусным, антимикробным, противоопухолевым, антипролиферативным эффектом.

1.3. Количественное определение содержания альфа-интерферона в сыворотке крови позволит прогнозировать исход заболевания и эффективность проводимого лечения.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного образца, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки, всего 96 определений при одновременном использовании всех стрипов планшета.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением антител к альфа-интерферону. В лунках, при добавлении исследуемого образца сыворотки крови, во время первой инкубации происходит связывание альфа-интерферона с моноклональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок планшета. Во время второй инкубации конъюгат поликлональных антител к альфа-интерферону человека с пероксидазой связывается с альфа-интерфероном, иммобилизованным в ходе первой инкубации. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации альфа-интерферона в анализируемых пробах.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация альфа-интерферона 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-интерферону, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, аттестованные относительно стандарта альфа-интерферона (фирма R&D Systems, Inc., США), содержащие известные количества альфа-интерферона – 0; 25; 50; 100; 200; 500 пг/мл; концентрации альфа-интерферона в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, лиофилизированные – 6 флаконов;

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

– контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием альфа-интерферона, лиофилизированная – 1 флакон;
– конъюгат поликлональных антител к альфа-интерферону с пероксидазой хрена, лиофилизированный – 1 флакон;
– раствор для разведения сывороток (РРС) – 1 флакон (13 мл);
– промывочный раствор, концентрат (ПР) – 2 флакона (по 28 мл);
– раствор для разведения тетраметилбензидина (РРТ) – 1 флакон (13 мл);
– тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 флакон (1,0 мл);
– стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл);
– пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
– трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;
– ванночка для реагента – 2 шт.;
– наконечники для пипеток на 4–200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перек-рестной реакции используемых в наборе антител к альфа-интерферону с антителами к гамма-интерферону и другим цитокинам человека.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения альфа-интерферона в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора альфа-ИНТЕРФЕРОН-ИФА-БЕСТ не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации альфа-интерферона в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей альфа-интерферон, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 25–500 пг/мл и составляет 90–110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации альфа-интерферона предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 50 пг/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация альфа-интерферона не превышает 5 пг/мл.

3.6. Клиническая проверка. Концентрацию альфа-интерферона измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 120 здоровых доноров юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20–50 лет. Концентрация альфа-интерферона у 50% здоровых доноров не определяется, у остальных – не превышает 20 пг/мл.

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

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента (0,5 М серная кислота), 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.

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 февраля 1991 г.

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, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

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

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

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм;
- шейкер орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при комнатной температуре (+18–25°С) и 600–800 об/мин;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 50, 100, 250 и 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкостей до 300 мкл;
- флаконы вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная лабораторная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

6.2. 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.

6.3. 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. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при комнатной температуре 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 влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок.

Хранить при температуре +2–8°С в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление рабочего промывочного раствора (раствора 1)

Готовится в мерном цилиндре.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата промывочного раствора и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от числа используемых стрипов.

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

Приготовленный рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре +2–8°С не более 5 сут.

7.4. Приготовление калибровочных проб и контрольной сыворотки

В каждый флакон с калибровочными пробами и контрольной сывороткой внести по 0,7 мл раствора 1, тщательно перемешать.

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

Приготовленные калибровочные пробы и контрольную сыворотку можно хранить при температуре +2–8°С не более 1 мес.

7.5. Приготовление концентрата конъюгата

Во флакон с концентратом конъюгата добавить 0,7 мл раствора 1, перемешать до полного растворения.

Приготовленный концентрат конъюгата можно хранить при температуре +2–8°С не более 1 мес.

7.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата

Готовить за 10–15 минут до окончания первой инкубации!

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от числа используемых стрипов.

В соответствии с числом используемых стрипов в отдельный чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество раствора 1 (п. 7.3.), добавить соответствующее количество концентрата конъюгата, тщательно перемешать.

Использовать в течение 1 ч после приготовления.

7.7. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина

Готовится за 5–10 мин до окончания второй инкубации!

Использовать в течение 3 ч после приготовления; хранить в защищенном от света месте.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от числа используемых стрипов.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в отдельный чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество РРТ, добавить соответствующее количество концентрата ТМБ, тщательно перемешать.

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.*

ПРОВЕДЕНИЕ ИФА

7.8. Внести во все лунки по 100 мкл раствора для разведения сывороток.

7.9. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл каждой калибровочной пробы и по 100 мкл контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 100 мкл анализируемых образцов сыворотки крови.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 15–20 мин

7.10. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 120 мин при встряхивании на шейкере при комнатной температуре (+18–25°С) и с частотой 700 об/мин.

7.11. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз рабочим промывочным раствором (п. 7.3.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. *Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого цикла промывки.* По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

7.12. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (см п. 7.6.).

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

7.13. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при комнатной температуре (+18–25°С) и с частотой 700 об/мин.

7.14. По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 5 раз рабочим промывочным раствором так, как это указано в п. 7.11.

7.15. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (см п. 7.7.) и инкубировать в темноте при комнатной температуре в течение 25 мин.

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

Для внесения рабочего раствора тетраметилбензидина использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

7.16. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и рабочий раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента. Встряхнуть планшет; при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; или при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху). Измерение проводить через 2–3 мин после остановки реакции.

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

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации альфа-интерферона в калибровочных пробах (пг/мл).

9.2. Определить содержание альфа-интерферона в контрольной сыворотке и анализируемых пробах по калибровочному графику. В случае дополнительного разведения анализируемых образцов (см. п. 10.3.) полученную концентрацию альфа-интерферона необходимо умножить на фактор разведения.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов альфа-ИНТЕРФЕ-РОН-ИФА-БЕСТ должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2–8°С в течение всего срока годности (12 мес). Допускается хранение набора при температуре до +25°С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

Транспортирование наборов должно производиться всеми видами крытого транспорта с соблюдением условий и требований, установленных на данном виде транспорта, при температуре от 2 до 8°С. Допускается транспортирование набора при температуре до 25°С не более 10 сут.

10.2. Дробное использование набора может быть реализовано не позднее 1 мес с момента проведения первого иммуноферментного анализа, но в пределах срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре +2–8°С в течение всего срока годности;
- приготовленные калибровочные пробы, контрольную сыворотку и концентрат конъюгата можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре +2–8°С не более 1 мес;
- концентрат тетраметилбензидина после вскрытия флакона можно хранить при температуре +2–8°С не более 1 мес;
- концентрат ФСБ-Т, растворы для разведения сывороток и тетраметилбензидина, стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре +2–8°С в течение всего срока годности набора;
- рабочий раствор конъюгата можно хранить при комнатной температуре (+18–25°С) не более 1 ч;
- рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре +2–8°С не более 5 сут;
- рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при комнатной температуре не более 3 ч;
- построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также реко-мендуется определение концентрации альфа-интерферона в контрольной сыворотке.

10.3. Если концентрация альфа-интерферона в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 500 пг/мл, образец следует дополнительно развести раствором для разведения сывороток в 20 раз (20 мкл исследуемого образца + 380 мкл раствора для разведения сывороток), повторить анализ и полученный результат умножить на 20.

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

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

Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

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

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

630559, Новосибирская область,
Новосибирский район,
п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 227-67-64,
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом.

Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

Все реагенты наборов, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

Антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют.

Не применять набор реагентов по назначению после окончания срока годности.

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).

1. Гарантийные обязательства

Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

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.

2. Обеспечение безопасности персонала

Обращение с материалами,
контактирующими с исследуемыми
образцами

Материалы, контактирующие с исследуемыми образцами, следует дезинфицировать согласно МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998).

Порядок утилизации или уничтожения компонентов набора

При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиНом 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

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

3. Обеспечение получения правильных результатов анализа

Достоверность и воспроизводимость результатов анализа зависят от выполнения следующих основных правил:

– 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 (перекись водорода, деохлор, хлорамин), в помещениях, где проводят ИФА, приводит к серьезному искажению результатов;

– не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгатов;

– ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и ТМБ;

– избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую посуду и чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;

– рабочие поверхности столов, оборудования следует обрабатывать 70% этиловым спиртом (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);

– никогда не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и раствора ТМБ;

– перед отбором ТМБ из флакона необходимо протереть конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) сначала дистиллированной водой, а затем 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение пипеток конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флаконов с РРТ и ТМБ;

– если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.

Качество промывки лунок планшета играет важную роль для получения правильных результатов анализа:

– Для аспирации анализируемых образцов и последующей промывки рекомендуется использовать автоматическое или ручное промывочное устройство.

– Не допускайте высыхания лунок планшета в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов.

– Добивайтесь полного заполнения и опорожнения всех лунок планшета в процессе промывки. Недостаточная аспирация жидкости в процессе промывки может привести к понижению чувствительности и специфичности анализа.

– Следите за состоянием промывочного устройства – регулярно (1 раз в неделю) обрабатывайте шланги и емкости 70% этиловым спиртом.

– Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно выполните процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой.

4. Условия правильности работы набора

Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если будут выполнены следующие условия:

– соотношение оптических плотностей калибровочных проб: $ОП_0 < ОП_{25} < ОП_{50} < ОП_{100} < ОП_{200} < ОП_{500}$;

– $ОП_{500} \geq 1{,}0$ ед. опт. плотн. (о.е.);

– $ОП_0 \leq 0{,}2$ о.е.;

– вычисленное по калибровочному графику значение концентрации альфа-ИНФ в контрольной сыворотке попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

$ОП_0$, $ОП_{25}$, $ОП_{50}$, $ОП_{100}$, $ОП_{200}$ и $ОП_{500}$ – среднее значение оптической плотности калибровочных проб 0, 25, 50, 100, 200 и 500 пг/мл соответственно.

5. Расчет результатов анализа

По результатам измерения вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности (ОП) в лунках с анализируемыми образцами.

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

Построить калибровочный график зависимости оптической плотности (ось ординат) от концентрации альфа-ИНФ (ось абсцисс) в калибровочных пробах. Для этого на прилагаемом трафарете для построения графика против концентрации каждой калибровочной пробы отложить соответствующее ей среднее значение оптической плотности. Последовательно соединить полученные точки отрезками прямых линий.

Пример калибровочного графика представлен на рисунке.

Определить концентрацию альфа-ИНФ в контрольной сыворотке и анализируемых образцах по калибровочному графику. Для этого на оси ординат отметить среднее значение ОП анализируемого образца. Провести прямую линию, параллельно оси абсцисс, до пересечения с калибровочным графиком. От точки пересечения опустить перпендикуляр на ось абсцисс.
По полученной точке пересечения определить значение концентрации альфа-ИНФ в образце.

6. Диагностическая значимость полученных результатов

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 стадии 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 рецидивирующему течению патологического процесса.

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

Уровни спонтанной и ФГА индуцированной продукции цитокинов клетками цельной крови и в сыворотке условно здоровых доноров приведены в таблице 2.

7. Краткая схема проведения ИФА для набора реагентов «альфа-ИНТЕРФЕРОН-ИФА-БЕСТ»

Использовать только после внимательного ознакомления с инструкцией!

Внести: по 100 мкл РРС;
по 100 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки в дубликатах;
по 100 мкл анализируемых образцов в дубликатах.

Инкубировать: 120 мин, 700 об/мин, 18–25°С.

Промыть: рабочим промывочным раствором, 350 мкл, 5 раз.

Внести: по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.

Инкубировать: 60 мин, 700 об/мин, 18–25°С.

Промыть: рабочим промывочным раствором, 350 мкл, 5 раз.

Внести: по 100 мкл рабочего раствора тетра-метилбензидина.

Инкубировать: 25 мин, 18–25°С, в темноте.

Внести: по 100 мкл стоп-реагента.

Измерить: ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

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

8. Графические символы

REF	Номер по каталогу	IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
Σ n	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов	NON STERILE	Не стерильно
LOT	Код партии		Температурный диапазон
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до ...		Обратитесь к инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению	YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 227-75-47.

Таблица 2

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

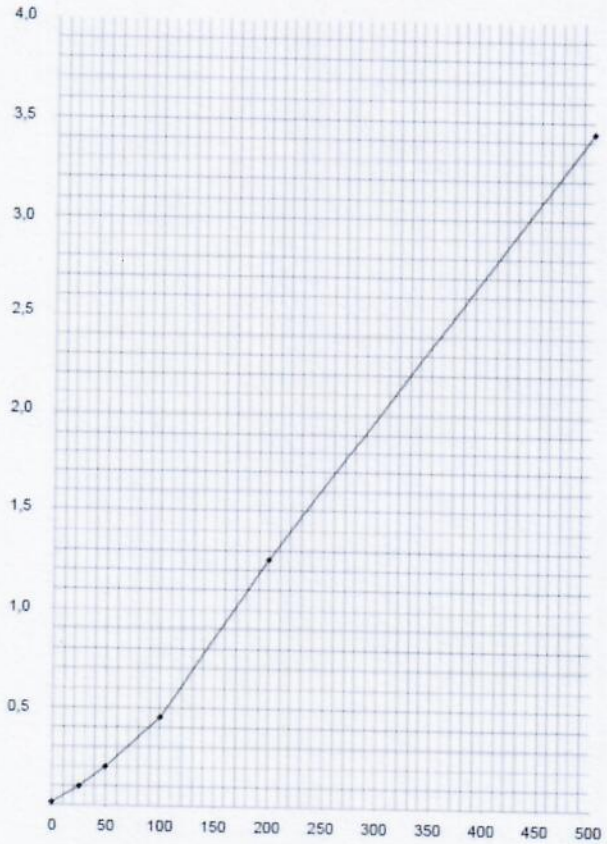
Цитокины	Спонтанная		ФГА индуцированная		Сыворотки	
	среднее пг/мл	диапазон пг/мл	среднее пг/мл	диапазон пг/мл	среднее пг/мл	диапазон пг/мл
ИНФ-α	1	0–6	3	0–13	0	0–5
ИЛ-4	0	0–2,4	0,24	0–24	0,2	0–4
ИНФ-γ	4	0–14	1200	165–7450	2	0–15
ИЛ-1β	50	0–107	440	50–1200	1,6	0–11
ИЛ-1РА	450	20–1740	1700	67–7450	520	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

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

Таблица 1

Расход компонентов набора реагентов

Кол-во одновременно используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор ТМБ		Рабочий промывочный раствор (раствор 1)	
	Конъюгат, мл	Раствор 1, мл	ТМБ, мл	РРТ, мл	ПР, концен-трат, мл	Дистил. вода, мл
1	0,05	1,0	0,07	1,0	2,0	до 50
2	0,10	2,0	0,14	2,0	4,0	до 100
3	0,15	3,0	0,21	3,0	6,0	до 150
4	0,20	4,0	0,28	4,0	8,0	до 200
5	0,25	5,0	0,35	5,0	10,0	до 250
6	0,30	6,0	0,42	6,0	12,0	до 300
7	0,35	7,0	0,49	7,0	14,0	до 350
8	0,40	8,0	0,56	8,0	16,0	до 400
9	0,45	9,0	0,63	9,0	18,0	до 450
10	0,50	10,0	0,70	10,0	20,0	до 500
11	0,55	11,0	0,77	11,0	22,0	до 550
12	0,60	12,0	0,84	12,0	24,0	до 600



Рисунок

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