

НАБІР РЕАГЕНТІВ

ФАКТОР НЕКРОЗУ ПУХЛИНИ АЛЬФА ELISA

TNF- α ELISA

Кат. № : EIA-4641
Кількість : 96

Дата випуску інструкції: 03-2019
Версія 3.0



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу і перекладу інструкції повинні збігатися.

1 ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментний аналіз для *in vitro* кількісного визначення людського фактору некрозу пухлини альфа (TNF- α) у сироватці.

2 КЛІНІЧНА ПЕРЕДУМОВА

2.1 Біологічна активність

Фактор некрозу пухлин Альфа (TNF- α), також називають хакектином, є 157 А.А. неглікозилований поліпептидний цитокин, який в основному продукується активованими макрофагами (моноцитами). Ліпополісахарид (LPS), компонент клітинної стінки грамнегативних бактерій (ендотоксин), є потужним стимулом для продукування TNF- α макрофагами, а TNF- α є важливим посередником добре відомих *in vivo* ефектів ЛПС, таких як пухлинний геморагічний некроз, лихоманка, шок та активація нейтрофілів. Різні біологічні активності TNF- α можна класифікувати як:

- *Протипухлинні та регулюючі процеси росту*: TNF- α виявляє селективну токсичність до клітин, інфікованих пухлинами та вірусами. І навпаки, він є ангіогенним і стимулює ріст культивованих фібробластів.
- *Імуномодулююча та прозапальна активність*: TNF- α активізує макрофаги, нейтрофіли та еозинофіли, а також ендотеліальні клітини (які проявляють прокоагулянтну активність). Він регулює вироблення антитіл В-клітинами та стимулює цитотоксичні Т-клітини. Він індукує вироблення кількох інших медіаторів запалення, таких як IL-1, IL-6, колоніестимулюючі фактори, простагландини, фактор активації тромбоцитів (PAF), колагенази тощо.
- *Метаболічна активність*: TNF- α сильно інгібує експресію гена ліпопротеїну та адипоцитів.

2.2 Клінічне застосування

TNF- α відіграє головну патогенну роль: при хакексії, пов'язаній з хронічними інфекційними або раковими захворюваннями; при септичному шоці, коли нейтралізація TNF- α захищає від гострої летальності; при відторгненні трансплантата та реакції «трансплантат проти господаря»; і при паразитарних інфекціях, де TNF- α може забезпечити певний захист, але також сприяє більш важким формам захворювання (наприклад, церебральній формі малярії). TNF- α , часто в поєднанні з іншими цитокинами, також бере участь у кількох аутоімунних захворюваннях і навіть у патогенезі артеросклерозу. Аномально високий рівень сироваткового TNF- α був описаний при септичному шоці, відторгненні трансплантату, паразитарних інфекціях, раку, після гемодіалізу, під час терапії цитокинами (IL-2) *in vivo* тощо. Крім огляду на патогенез, ці визначення можуть допомогти у діагностуванні (наприклад, відторгнення трансплантату) і мають прогностичне значення (наприклад, при системних інфекціях).

3 ПРИНЦИПИ МЕТОДУ

DRG TNF- α -ELISA - це твердофазний імуноаналіз посиленої чутливості до ензиму, що виконується на мікротитровому планшеті. В аналізі використовуються моноклональні антитіла (MAbs), спрямовані проти різних епітопів TNF- α . Стандарти та зразки реагують з іммобілізованим моноклональним антитілом (MAB 1), нанесеним на лунку мікротитру та моноклональним антитілом (MAB 2), позначеним пероксидазою хрому (HRP). Після інкубаційного періоду, що дозволяє утворити «сандвіч»: покриті MAB 1 - людський TNF- α - MAB 2 - HRP, мікротитровий планшет промивають, щоб видалити нез'язане антитіло, позначене ферментом. Зв'язане антитіло, позначене ферментом, вимірюється шляхом хромогенної реакції. Хромогенний розчин (TMB) додають та інкубують. Реакцію зупиняють додаванням стоп-розчину і потім планшет мікротитрів зчитують на відповідній довжині хвилі. Кількість обороту субстрату визначається колориметрично, шляхом вимірювання абсорбції, яка є пропорційною до концентрації TNF- α .

Перекладач Романюк Н.П.

Потрібно намалювати калібрувальну криву, а концентрацію TNF- α у зразках визначити інтерполяцією від калібрувальної кривої. Використання зчитувача ELISA (лінійність до 3 одиниць ОЩ) та складний метод зменшення даних (зменшення поліхроматичних даних) призводять до високої чутливості в низькому діапазоні та в розширеному діапазоні калібрування.

4 РЕАГЕНТИ, ЯКІ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

	Реагенти	96 тестів/набір	Відновлення
MICROTITERPLATE	Мікротитровий планшет з 96 лунками, покритими анти-TNF- α (моноклональні антитіла)	96 лунок	Готовий до використання
Ab HRP CONC	Кон'югат: HRP позначений анти-TNF- α (моноклональні антитіла) в буфері ТРИС-Малеат з бичачим сироватковим альбуміном і тимолом	1 флакон 0.75 мл	Додати кон'югатний буфер (див. розділ 6)
CAL 0	Нульовий калібратор у людській плазмі, бензамідин та тимола	2 флакони Ліюфіл.	Додати дистильовану воду (для точного об'єму див. етикетку)
CAL N	Калібратор N = від 1 до 5 (див. точні значення на етикетках флаконів, у людській плазмі, бензамідині та тимолаі.	5 флаконів Ліюфіл.	Додати 2 мл дистильованої води
CON BUF	Кон'югатний Буфер: ТРИС-Малеатний буфер з бичачим сироватковим альбуміном, ЕДТА та тимолом	1 флакон 6 мл	Готовий до використання
INC BUF	Буфер для інкубації: ТРИС-Малеатний буфер з бичачим сироватковим альбуміном, ЕДТА та тимолом	1 флакон 6 мл	Готовий до використання
WASH SOLN CONC	Концентрат промивного розчину (Трис-HCl)	1 флакон 10 мл	Розвести 200 x дистильованою водою (використовувати магнітний змішувач)
CONTROL N	Контроль- N = 1 або 2 у людській плазмі та тимолаі	2 флакони Ліюфіл.	Додати 2 мл дистильованої води
CHROM TMB	Хромоген ТМБ (Тетраметилбензидин)	1 флакон 12 мл	Готовий до використання
STOP SOLN	Стоп розчин: HCl 1.0N	1 флакон 12 мл	Готовий до використання

Примітка:

1. Використовуйте 0 Калібратор для розведення зразків.
2. 1 пг приготування калібратора еквівалентне до 40 мОд NIBSC IS 87/650.

5 МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

Наступний матеріал необхідний, але не входить до складу набору:

1. Дистильована вода високої якості.
2. Піпетки ємністю 50 мкл, 200 мкл, 1 мл та 10 мл (рекомендується використовувати піпетки з одноразовими пластиковими наконечниками)
3. Вортексний мікшер
4. Магнітний змішувач
5. Горизонтальний мікротитровий планшетний шейкер зі здатністю 700 об/хв \pm 100 об/хв.
6. Вошер мікротитрових планшетів
7. Мікротитровий зчитувач планшетів зі здатністю зчитування при 450 нм, 490 нм та 650 нм (у випадку поліхроматичного зчитування) або зі здатністю зчитування при 450 нм та 650 нм (біхроматичне зчитування).

6 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

А. Калібратори:

Відновіть нульовий калібратор дистильованою водою та інші калібратори з 2 мл дистильованої води до об'єму, вказаного на етикетці флакону.

В. Контролі:

Відновіть контролі з 2 мл дистильованої води.

С. Розчин кон'югату:

Слідуючи кількості лунок, які будете використовувати, розведіть концентрований кон'югат кон'югатним буфером в чистому скляному флаконі: див. таблицю щодо обсягів, які потрібно піпетувати. Рекомендується одночасна підготовка.

Розведений кон'югат стабільний макс. 1 тиждень при температурі 2°С - 8°С.

ТАБЛИЦЯ РОЗВЕДЕННЯ КОН'ЮГАТУ

Кількість лунок	Концентрований кон'югат	Кон'югатний буфер	Робочий об'єм
8	50 мкл	500 мкл	550 мкл
16	100 мкл	1000 мкл	1100 мкл
24	150 мкл	1500 мкл	1650 мкл
32	200 мкл	2000 мкл	2200 мкл
48	300 мкл	3000 мкл	3300 мкл
96	600 мкл	6000 мкл	6600 мкл

Д. Робочий промивний розчин:

Підготуйте відповідний об'єм Робочого Промивного розчину додаючи 199 об'ємів дистильованої води до 1 об'єму Промивного розчину (200x). Використовуйте магнітний змішувач, щоб гомогенізувати. Наприкінці дня, утилізуйте не використаний Робочий Промивний розчин.

7 ЗБЕРІГАННЯ ТА ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ РЕАГЕНТІВ

- До відкриття або відновлення, всі компоненти набору залишаються стабільними до вказаного терміну придатності за умови зберігання при температурі 2°С - 8°С.
- Невикористані стрипи потрібно зберігати при температурі 2°С - 8°С, у герметично закритій упаковці з осушувачем до закінчення терміну придатності.
- Після відновлення, стандарти та контролі стабільні протягом 4 днів при температурі 2°С - 8°С. Для більш тривалого періоду зберігання, потрібно зробити аліквоти та зберігати при температурі -20°С максимум 2 місяці. Уникати повторних циклів розмороження/замороження.
- Концентрований Промивний розчин стабільний при температурі 18°С - 25°С до закінчення терміну придатності.
- Свіжоприготовлений Робочий промивний розчин потрібно використати у той самий день.
- Після першого використання, кон'югат стабільний до закінчення терміну придатності, за умови, якщо його зберігати в оригінальному добре закритому флаконі при температурі 2°С - 8°С.
- Зміни фізичного вигляду реагентів набору можуть свідчити про нестабільність або погіршення стану.

8 ЗАБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКА

- Після згортання та центрифугування, сироватку слід очистити від згустків червоних клітин якомога скоріше та зберігати при температурі 4°С. Якщо зразки не використовуються одразу, їх слід зберігати при температурі -20°С максимум протягом 2 місяців, та при температурі -70°С для більш тривалого зберігання (максимально один рік).
- Уникати повторних циклів замороження/розмороження.
- Перед використанням, усі зразки повинні бути 18°С - 25°С.

Рекомендовано, щоб до початку використання вихрувати зразки.

- Умови забору зразків можуть впливати на значення, тому під час забору проб слід суворо дотримуватися запобіжних заходів, щоб уникнути домішок, що містяться в матеріалах для відбору проб, які стимулювали б вироблення TNF- α клітинами крові і, таким чином, помилково збільшували сироваткові значення TNF- α .
- Пробірки для збору зразків не повинні містити піроген.

9 ПРОЦЕДУРА

9.1 Примітки щодо обробки

Не використовуйте набір або компоненти набору після закінчення терміну придатності.

Не змішуйте матеріали з різних лотів набору.

Перед використанням доведіть усі реагенти до температури 18°С - 25°С.

Ретельно перемішайте реагенти та зразки, збовтуючи та обертаючи їх.

Проводити тестування калібраторів, контролів та зразків у дублікаті.

Рекомендується вертикальне випрямлення.

Використовуйте чистий пластиковий контейнер для приготування Промивного розчину.

Для того, щоб уникнути перехресного забруднення, використовуйте чистий одноразовий наконечник для додавання кожного реагенту та зразка.

Для внесення Розчину виявлення та Стоп розчину уникайте піпеток з металевими частинами.

Високопрецизійні піпетки або автоматичне обладнання для піпетування вдосконалять точність.

Дотримуйтеся часу інкубації.

Уникайте зміщення, час між піпетуванням першого стандарту та останнього зразка повинен бути обмежений до часу, вказаного у розділі *Затримка часу*.

Підготуйте калібрувальну криву для кожного запуску, не використовуйте дані з попередніх запусків.

Хромогенний ТМБ розчин повинен бути безбарвним. Якщо протягом кількох хвилин після приготування утворюється синій колір, то це свідчить про непридатність реагенту і його слід утилізувати.

Внесіть Хромогенний розчин ТМБ протягом 15 хвилин після промивання мікротитрового планшету.

Під час інкубації з відновлювальним розчином, уникайте прямого попадання сонячного світла на мікротитровий планшет.

9.2 Процедура

1. Вибрати необхідну кількість стрипів для запуску. Не використані стрипи слід знову запакувати разом з осушувачем та зберігати при температурі 2°С - 8°С.
2. Закріпити стрипи у рамці-тримачі.
3. Піпетувати 50 мкл буферу для інкубації в усі лунки.
4. Піпетувати 200 мкл кожного Калібратора, Контролю та Зразка у відповідні лунки.
5. Інкубувати протягом 2 годин при температурі 18°С - 25°С на горизонтальному шейкері встановленому на 700 об/хв \pm 100 об/хв.
6. Аспірувати рідину з кожної лунки.
7. Промити планшет 3 рази:
Додати 0.4 мл Промивного розчину у кожен лунку.
Аспірувати вміст кожної лунки.
8. Піпетувати 100 мкл нульового калібратора у всі лунки.
9. Піпетувати 50 мкл кон'югату анти-TNF- α -HRP у всі лунки.
10. Інкубувати протягом 2 годин при температурі 18°С - 25°С на горизонтальному шейкері, встановленому на 700 об/хв \pm 100 об/хв.
11. Аспірувати рідину з кожної лунки.
12. Промити планшет 3 рази:
Внести 0.4 мл промивного розчину у кожен лунку.
Аспірувати вміст кожної лунки.
13. Піпетувати 100 мкл Хромогену ТМБ у кожен лунку протягом 15 хвилин після етапу промивання.
14. Інкубувати мікротитровий планшет протягом 15 хвилин при температурі 18°С - 25°С на горизонтальному шейкері встановленому на 700 об/хв \pm 100 об/хв, уникаючи попадання прямого сонячного світла.
15. Піпетувати 100 мкл Стоп розчину у кожен лунку.
16. Зчитати абсорбції при 450 нм та 490 нм (референсний фільтр 630 нм або 650 нм) протягом 30 хвилин 3 годин та обчислити результати як описано у розділі 10.

10 ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

10.1 Поліхроматичне зчитування

1. У цьому випадку програмне забезпечення буде виконувати обробку даних.
2. Перше зчитування планшету виконується при 450 нм до референсного фільтру встановленого на 650 нм (або 630 нм).

- Друге зчитування проводиться при 490 нм до того ж референсного фільтру.
- Програмне забезпечення буде автоматично керувати читачем та інтегрувати обидва зчитування в поліхроматичну модель. Ця методика може генерувати ОЩ до 10.
- Принцип обробки поліхроматичних даних наступний:
 $X_i = \text{ОЩ при } 450 \text{ нм}$
 $Y_i = \text{ОЩ при } 490 \text{ нм}$
 За допомогою стандартної незваженої лінійної регресії обчислюються параметри А та В: $Y = A \times X + B$:
 Якщо $X_i < 3$ ОЩ одиниць, тоді Х обчислений = X_i
 Якщо $X_i > 3$ ОЩ одиниць, тоді Х обчислений = $(Y_i - B) / A$
 4-параметрова логістична крива використовується для побудови калібрувальної кривої.
 Концентрація TNF- α у зразках визначається інтерполяцією на калібрувальній кривій.

10.2 Біхроматичне зчитування

- Зчитайте планшет при 450 нм проти референсного фільтру встановленого на 650 нм (або 630).
- Обчисліть середнє значення подвійних вимірювань.
- На напів-логарифмічному або на лінійно-графічному папері позначте значення ОЩ (на осі ординат) для кожного стандарту до відповідної концентрації TNF- α (на осі абсцис) та намалюйте калібрувальну криву через точки стандарту, з'єднуючи позначені точки прямими лініями.
- Зчитайте концентрацію для кожного контролю та зразка інтерполюючи на калібрувальній кривій.
- Комп'ютерне скорочення даних спростить ці розрахунки. Якщо використовується автоматична обробка результатів, рекомендується 4-параметрова логістична функціональна крива.

11 ТИПОВІ ДАНІ

Наведені нижче дані є лише ілюстративними і ніколи не повинні використовуватися замість калібрувальної кривої в реальному часі.

TNF- α -ELISA		ОЩ одиниці Поліхроматична модель
Стандарт	0 пг/мл	0.045
	6,8 пг/мл	0.120
	18 пг/мл	0,259
	52 пг/мл	0.619
	176 пг/мл	1.435
	518 пг/мл	3.237

12 ПРОДУКТИВНІСТЬ ТА ОБМЕЖЕННЯ

12.1 Межа виявлення

Двадцять нульових стандартів аналізували разом з набором інших стандартів. Межа виявлення, визначена як уявна концентрація двох стандартних відхилень вище середнього значення ОЩ при нульовому зв'язуванні, становила 0.7 пг/мл.

12.2 Специфічність

Значної перехресної реакції не спостерігалось у присутності 50 нг IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TNF- β , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TGF- β , GM-CSF, OSM, MIP-1 α , MIP-1 β , LIF, MCP-1, G-CSF та RANTES.

Цей аналіз TNF- α специфічний для природного та рекомбінантного TNF- α людини.

12.3 Точність

В аналізі				Між аналізами			
Сироватка	К-сть	<X> \pm СВ (пг/мл)	КВ (%)	Сироватка	К-сть	<X> \pm СВ (пг/мл)	КВ (%)
A	20	91 \pm 6	6.6	A	24	122 \pm 5	4.5
B	20	526 \pm 33	6.3	B	24	431 \pm 14	3.3

СВ: Стандартне відхилення; КВ: коефіцієнт варіації

12.4 Правильність

ТЕСТУВАННЯ ВІДНОВЛЕННЯ

Перекладач Романюк Н.П.

Зразок	Доданий TNF- α (пг/мл)	Відновлений TNF- α (пг/мл)	Відновлення (%)
Сироватка 1	0	6.2	-
	38.4	43.3	97
	83.9	90.0	100
	188.3	192.5	99
	408.2	376.2	91
Сироватка 2	0	3,8	-
	38,4	45,5	108
	83,9	91,2	104
	188,3	162,2	84
	408,2	379,2	92

ТЕСТУВАННЯ РОЗВЕДЕННЯ

Зразок	Розведення	Теоретична концетр. (пг/мл)	Вимір. Концентр. (пг/мл)
Сироватка 1	1	-	436.5
	2	218.3	212.4
	4	109.1	104.8
	8	54.6	59.5
	16	27.3	31.7
Сироватка 2	1	-	420.2
	2	210.1	211.2
	4	105.0	98
	8	52.5	58.3
	16	26.3	30.7

Зразки розводили нульовим стандартом.

12.5 Затримка в часі між останнім стандартом та внесенням зразків

Як показано далі, результати аналізів залишаються точними навіть тоді, коли зразок додають через 30 хвилин після додавання стандартів до покритих лунок.

	T0	30 хв	45 хв
SC1	202	183	222
SC2	506	520	565

13 ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Якщо результати, отримані для Контролю 1 та/або Контролю 2, не знаходяться в межах, визначених на етикетці флакону, результати не можна використовувати, якщо не буде надано задовільного пояснення невідповідності.

Бажано, щоб кожна лабораторія могла зробити власні пули контрольних зразків, які слід зберігати замороженими у аліквотах. Контролі, що містять азид, будуть перешкоджати ферментативній реакції, тому їх не можна використовувати.

Критерії прийняття різниці між подвійними результатами зразків повинні спиратися на добру лабораторну практику.

Рекомендується, регулярно аналізувати контролю як невідомі зразки для вимірювання варіабельності аналізу. Ефективність аналізу слід контролювати за допомогою діаграм контролю якості контролів.

Хорошою практикою є візуальна перевірка відповідності кривої, обраної комп'ютером.

14 РЕФЕРЕНСНІ ІНТЕРВАЛИ

Ці значення наведені лише для орієнтиру; кожна лабораторія повинна встановити власний нормальний діапазон значень.

Для орієнтиру, результати 30 зразків сироватки від здорових людей із низьким рівнем СРБ, коливалися між 4.6 та 12.4 пг/мл.

15 ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Безпека

Тільки для діагностики *in vitro*.

Компоненти крові людини, що входять до цього набору, були протестовані затвердженими європейськими та/або FDA методами і виявлені, що є негативними до HBsAg, анти-HCV, анти-HIV-1/2. Жоден відомий метод не може гарантувати, що похідні крові людини не передають гепатит, СНІД та інші інфекції. Тому поводження з реагентами, зразками сироватки чи плазми повинно відповідати місцевим процедурам безпеки.

Всі продукти тваринного походження та їх похідні були зібрані від здорових тварин. Компоненти великої рогатої худоби походять з країн, де корови не

хворіли на сказ. Тим не менш, компоненти, що містять речовини тваринного походження, слід розглядати як потенційно інфекційні.
 Уникайте будь-якого контакту шкіри з усіма реагентами, Стоп-розчин містить HCl. У разі контакту ретельно вимийте водою.
 Забороняється курити, пити, їсти та використовувати косметику на робочому місці. Не піпетувати ротом. Одягати захисний одяг та одноразові рукавиці.

16 РЕЗЮМЕ ПРОТОКОЛУ

	КАЛІБРАТОРИ (мкл)	ЗРАЗОК(И) КОНТРОЛІ (мкл)
Буфер для інкубації	50	50
Калібратор (0-5)	200	-
Зразки, Контролі	-	200
Інкубувати протягом 2 годин при температурі 18°C - 25°C при постійному струшуванні при 700 об/хв. Аспірувати вміст кожної лунки. Промити 3 рази з 400 мл Промивного розчину та аспірувати.		
Нульовий калібратор	100	100
Анти-TNF- α -HRP кон'югат	50	50
Інкубувати протягом 2 годин при температурі 18°C-25°C при постійному струшуванні при 700 об/хв. Аспірувати вміст кожної лунки. Промити 3 рази з 400 мл Промивного розчину та аспірувати.		
Хромогенний розчин	100	100
Інкубувати протягом 15 хвилин при температурі 18°C-25°C при постійному струшуванні при 700 об/хв.		
Стоп розчин	100	100
Зчитайте на мікротитровому зчитувачі планшетів та запишіть абсорбцію кожної лунки при 450 нм (та 490 нм) проти 630 (або 650 нм)		



ВИРОБНИК

DRG Instrumente GmbH
 вул. Фраунберг 18, 35039
 м. Марбург, Німеччина
 Тел: +49(0)64 21/170 00
 Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drq-diagnostics.de
 e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
 вул. Симона Петлюри, 25
 м. Івано-Франківськ, 76014
 тел.: +38 (0342) 775 122
 факс: +38 (0342) 775 123
 e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

