

ВЕКТОР



Набор реагентов  
для иммуноферментного определения  
концентрации фактора некроза опухолей-  
альфа в сыворотке крови

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

---

---

**альфа-ФНО – ИФА – БЕСТ**

НАБОР РЕАГЕНТОВ  
**A-8756**



## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения человеческого альфа-ФНО в биологических жидкостях человека и культуральных средах.

Альфа-ФНО относится к провоспалительным цитокинам, состоит из длинных вытянутых  $\beta$ -цепей. Молекулярная масса 17 кД. Альфа-ФНО проявляет избирательную цитотоксичность в отношении некоторых опухолевых клеток; активирует гранулоциты, макрофаги, эндотелиальные клетки, гепатоциты (продукция белков острой фазы), остеокласты и хондроциты (резорбция костной и хрящевой ткани), транскрипцию других провоспалительных цитокинов; стимулирует пролиферацию и дифференцировку нейтрофилов, фибробластов, эндотелиальных клеток (ангиогенез), гемопоэтических клеток, Т- и В-лимфоцитов; усиливает поступление нейтрофилов из костного мозга в кровь; обладает противоопухолевой и противовирусной активностью *in vivo* и *in vitro*.

Альфа-ФНО, как и другие цитокины является важным низкомолекулярным медиатором межклеточных взаимодействий. Количественное определение уровня альфа-ФНО имеет большое значение при оценке иммунного статуса организма.

## 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

### 2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

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

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках с иммобилизованными антителами. Имеющийся в образцах альфа-ФНО связывается с иммобилизованными антителами. Несвязавшийся материал удаляется отмывкой. Связавшийся альфа-ФНО взаимодействует при инкубации с конъюгатом №1 (антитела к альфа-ФНО человека с биотином). Несвязавшийся конъюгат №1 удаляется отмывкой. На третьей стадии связавшийся конъюгат №1 взаимодействует при инкубации с конъюгатом №2 (стрептавидин с пероксидазой хрена). После третьей отмывки количество связавшегося конъюгата № 2 определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы хрена – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Реакцию останавливают добавлением раствора стоп-реагента и измеряют оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм. Интенсивность желтого окрашивания пропорциональна концентрации содержащегося в образце альфа-ФНО.

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

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

Обращайтесь с сыворотками пациентов как с потенциально инфекционно опасными.

Диапазон измеряемых концентраций 0–250 пг/мл.

## 2.2. СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный с иммобилизованными моноклональными антителами к альфа-ФНО – 1 шт.;
- калибровочные образцы, лиофилизированные, аттестованные относительно стандарта альфа-ФНО (фирма RnDSystems, Inc., США), содержащие альфа-ФНО – 0, 5, 15, 40, 100 и 250 пг/мл – 6 фл.;
- контрольный образец, лиофилизированный, содержащий альфа-ФНО, концентрация указана на флаконе – 1 фл.;
- конъюгат №1 – биотинилированные антитела к альфа-ФНО, лиофилизированный – 1 фл.;
- конъюгат №2 – стрептавидин-пероксидаза хрена, лиофилизированный – 1 фл.;
- раствор для разведения сывороток (PPC) – 1 фл., 13 мл;

- раствор для предварительного разведения конъюгата №2 (РПК2) – 1 фл., 1 мл
- раствор для разведения конъюгата №2 (РПК2) – 1 фл., 13 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 2 фл. по 28 мл;
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 фл., 1 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 фл., 13 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 12 мл;
- пленка для заклеивания планшета – 3 шт.;
- ванночка для реагентов – 4 шт.;
- наконечники для пипеток – 32 шт.;
- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.

### 2.3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

**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-17, ИЛ-18, гамма-ИНФ, альфа-ИНФ, рецепторный антагонист ИЛ-1.

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

**Линейность.** Зависимость концентрации альфа-ФНО в образцах биологических жидкостях человека и культуральных средах при разведении их РРС имеет линейный характер в диапазоне концентраций 5–250 пг/мл и составляет 90–110%.

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

**Чувствительность.** Минимально определяемая концентрация альфа-ФНО, рассчитанная на основании среднего арифметического значения из десяти измерений оптической плотности калибровочной пробы 0 пг/мл плюс 2  $\sigma$  (среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения) не превышает 2 пг/мл.

**Клиническая проверка.** Концентрацию альфа-ФНО измеряли в сыворотке (плазме) крови, взятой с 9 до 11 ч, у 196 здоровых лиц юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20–50 лет. Средняя концентрация альфа-ФНО составила 0,5 пг/мл (0 – 6 пг/мл). Уровни спонтанной и ФГА индуцированной продукции цитокинов клетками цельной крови и в сыворотке условно здоровых доноров ( $n = 68$ ) приведены в таблице № 1.

**Уровни спонтанной и ФГА индуцированной продукции цитокинов клетками цельной крови и в сыворотке условно здоровых доноров (n = 68, \*n=31).**

| Цитокины | спонтанная       |                   | ФГА индуцированная |                   | сыворотки        |                   |
|----------|------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------------------|
|          | Среднее<br>пг/мл | Диапазон<br>пг/мл | Среднее<br>пг/мл   | Диапазон<br>пг/мл | Среднее<br>пг/мл | Диапазон<br>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                | 0-10              |
| 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              |
| ИЛ-17*   | 2,4              | 1-10              | 422                | 70-1500           | 1,2              | 0-5               |

### **3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

**3.1.** Потенциальный риск применения набора – класс 2б.

**3.2.** Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента, являются нетоксичными.

Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. *В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.*

**3.3.** При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

**3.4.** 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.

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

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

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

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

#### 4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм; 620–650 нм;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$  и 500–700 об/мин;
- устройство для промывки планшет;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 20, 50, 100, 250 и 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 100, 250 мкл;
- флаконы стеклянные вместимостью 10–15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная лабораторная.

## **5. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**

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

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

**5.3.** Образцы сывороток и плазмы сильно гемолизированные, сильно липемичные или мутные могут давать недостоверные результаты. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать 10–15 минут при 3000 об/мин.

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

**5.5.** От соблюдения этих требований зависит точность и воспроизводимость результатов анализа.

## **6. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ**

### **6.1. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ НАБОРА**

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

### **6.2. ПРАВИЛА РАБОТЫ ПРИ ДРОБНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА**

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

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

**6.2.3.** Калибровочные и контрольный образцы после восстановления и отбора части содержимого (не позднее 1 часа после восстановления) разлить по 150 мкл, плотно закрыть, поместить в морозильник и хранить при минус 16–20°C в течение 4 недель, но в пределах срока годности набора. *Не допускать повторных циклов замораживания – оттаивания!*

### **6.3. ПОДГОТОВКА СТРИПОВ**

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользован-

ные стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и поместить в холодильник.

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

#### 6.4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА 1

Количество концентрата ФСБ-Т и дистиллированной воды для приготовления раствора 1, в зависимости от числа стрипов, приведено в таблице №2 расхода компонентов набора реагентов. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при 30–40°C до полного растворения осадка.

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

#### 6.5. ПОДГОТОВКА КАЛИБРОВОЧНЫХ И КОНТРОЛЬНОГО ОБРАЗЦОВ

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

*Хранение:* при минус 16–20°C в течение 4 недель (п. 6.2.3.).

#### 6.6. ПОДГОТОВКА КОНЦЕНТРАТА КОНЪЮГАТА №1

Конъюгат №1 восстановить в 0,7 мл раствора 1 (п. 6.4.). Выдержать до полного растворения содержимого, тщательно перемешивая.

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

Таблица расхода компонентов

| Колличество<br>одновременно<br>используемых<br>стрипов | Раствор 1                        |                                      | Рабочий раствор<br>конъюгата №1         |                  | Рабочий раствор<br>конъюгата №2         |             | Рабочий раствор<br>тетраметилбен-<br>зидина |            |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|------------------|-----------------------------------------|-------------|---------------------------------------------|------------|
|                                                        | ФСБ-Т,<br>концент-<br>рат,<br>мл | Дистилли-<br>рованная<br>вода,<br>мл | Конъюгат<br>№1, кон-<br>центрат,<br>мкл | Раствор<br>1, мл | Конъюгат<br>№2, кон-<br>центрат,<br>мкл | РРК2,<br>мл | ТМБ,<br>концент-<br>рат,<br>мкл             | СБР,<br>мл |
| 1                                                      | 2,0                              | 48                                   | 50                                      | 1,0              | 50                                      | 1,0         | 70                                          | 1,0        |
| 2                                                      | 4,0                              | 96                                   | 100                                     | 2,0              | 100                                     | 2,0         | 140                                         | 2,0        |
| 3                                                      | 6,0                              | 144                                  | 150                                     | 3,0              | 150                                     | 3,0         | 210                                         | 3,0        |
| 4                                                      | 8,0                              | 192                                  | 200                                     | 4,0              | 200                                     | 4,0         | 280                                         | 4,0        |
| 5                                                      | 10                               | 240                                  | 250                                     | 5,0              | 250                                     | 5,0         | 350                                         | 5,0        |
| 6                                                      | 12,0                             | 288                                  | 300                                     | 6,0              | 300                                     | 6,0         | 420                                         | 6,0        |
| 7                                                      | 14,0                             | 336                                  | 350                                     | 7,0              | 350                                     | 7,0         | 490                                         | 7,0        |
| 8                                                      | 16,0                             | 384                                  | 400                                     | 8,0              | 400                                     | 8,0         | 560                                         | 8,0        |
| 9                                                      | 18,0                             | 432                                  | 450                                     | 9,0              | 450                                     | 9,0         | 630                                         | 9,0        |
| 10                                                     | 20,0                             | 480                                  | 500                                     | 10,0             | 500                                     | 10,0        | 700                                         | 10,0       |
| 11                                                     | 22,0                             | 528                                  | 550                                     | 11,0             | 550                                     | 11,0        | 770                                         | 11,0       |
| 12                                                     | 24,0                             | 576                                  | 600                                     | 12,0             | 600                                     | 12,0        | 840                                         | 12,0       |

#### 6.7. ПОДГОТОВКА КОНЦЕНТРАТА КОНЪЮГАТА №2

Конъюгат №2 восстановить в 0,7 мл РПРК2. Выдержать до полного растворения содержимого, тщательно перемешивая.

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

#### 6.8. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА КОНЪЮГАТА №1

*Готовить за 10–15 минут до окончания  
первой инкубации!*

При проведении реакции на 1 стрипе в чистый флакон внести 1,0 мл раствора 1 (п. 6.4.), добавить 50 мкл концентрата конъюгата №1, тщательно перемешать (см. таблицу расхода компонентов).

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

#### 6.9. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА КОНЪЮГАТА №2

*Готовить за 10–15 минут до окончания  
второй инкубации!*

При проведении реакции на 1 стрипе в чистый флакон внести 1,0 мл РРК2, добавить 50 мкл концентрата конъюгата №2, тщательно перемешать (см. таблицу расхода компонентов).

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

#### 6.10. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА ТМБ

**Внимание!** *Рекомендуется выделить наконечники для пипеток, которые использовать*

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

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

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

## 7. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

### 7.1. ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

Приготовить раствор 1 (п. 6.4.), калибровочные и контрольный образцы (п. 6.5.), концентрированные растворы конъюгатов №1 и №2 (п. 6.6., 6.7.).

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

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

### 7.2. ВНЕСЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНЫХ, КОНТРОЛЬНОГО И АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ, ИНКУБАЦИЯ

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

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

Стрипы закрыть, плотно прижав пленку, поместить в шейкер. Инкубировать 120 мин при температуре 37°C при 700 об/мин.

По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить

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

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

За 10 мин до окончания инкубации приготовить рабочий раствор конъюгата №1 (п. 6.8.).

### 7.3. ВНЕСЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА КОНЪЮГАТА №1, ИНКУБАЦИЯ

**Внимание!** Для внесения рабочего раствора конъюгата №1 использовать пластиковую ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

В каждую лунку стрипов внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата №1.

Стрипы закрыть пленкой, поместить в шейкер. Инкубировать 60 мин при температуре 37°C, при 700 об/мин.

За 10 мин до окончания инкубации приготовить рабочий раствор конъюгата №2 (п. 6.9.).

#### 7.4. ОТМЫВКА ОТ КОНЪЮГАТА №1

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

#### 7.5. ВНЕСЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА КОНЪЮГАТА №2, ИНКУБАЦИЯ

**Внимание!** Для внесения рабочего раствора конъюгата №2 использовать пластиковую ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

В каждую лунку стрипов внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата №2.

Стрипы закрыть пленкой, поместить в шейкер. Инкубировать 30 мин при температуре 37°C, при 700 об/мин.

За 10 мин до окончания инкубации приготовить раствор ТМБ (п. 6.10.).

#### 7.6. ОТМЫВКА ОТ КОНЪЮГАТА №2

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

#### 7.7. ВНЕСЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА ТМБ, ИНКУБАЦИЯ

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

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

## 7.8. ОСТАНОВКА РЕАКЦИИ

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

## 8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

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

## 9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

**9.1.** Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации альфа-ФНО в калибровочных образцах в координатах: ось абсцисс – концентрация альфа-ФНО (пг/мл); ось ординат – значение оптической плотности образца.

Для этого значение оптической плотности, соответствующее концентрации альфа-ФНО в каждом калибровочном образце, откладывают на миллиметровой бумаге или на прилагаемом

трафарете для построения калибровочного графика. По полученным точкам проводят калибровочную кривую, соединяя их отрезками.

**9.2.** Для определения концентрации альфа-ФНО в анализируемых пробах на оси ординат отмечают значение ОП анализируемого образца.

Проводят прямую до пересечения с калибровочной кривой, от полученной точки пересечения опускают перпендикуляр на ось абсцисс. Точка пересечения и является искомым значением концентрации альфа-ФНО.

Контрольный образец служит для проверки точности и достоверности результатов. Если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации альфа-ФНО в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке, значит, полученные величины концентраций альфа-ФНО в образцах считают достоверными. Уровень альфа-ФНО в сыворотках здоровых доноров находится в диапазоне 0–6,0 пг/мл, среднее 0,5 пг/мл.

Пример калибровочной кривой представлен на рисунке.

**9.3.** Образцы с содержанием альфа-ФНО в пробе, превышающем 250 пг/мл, следует развести в 20 раз раствором для разведения сывороток (РРС) и повторить анализ еще раз.

В случае дополнительного разведения анализируемых образцов полученную концен-

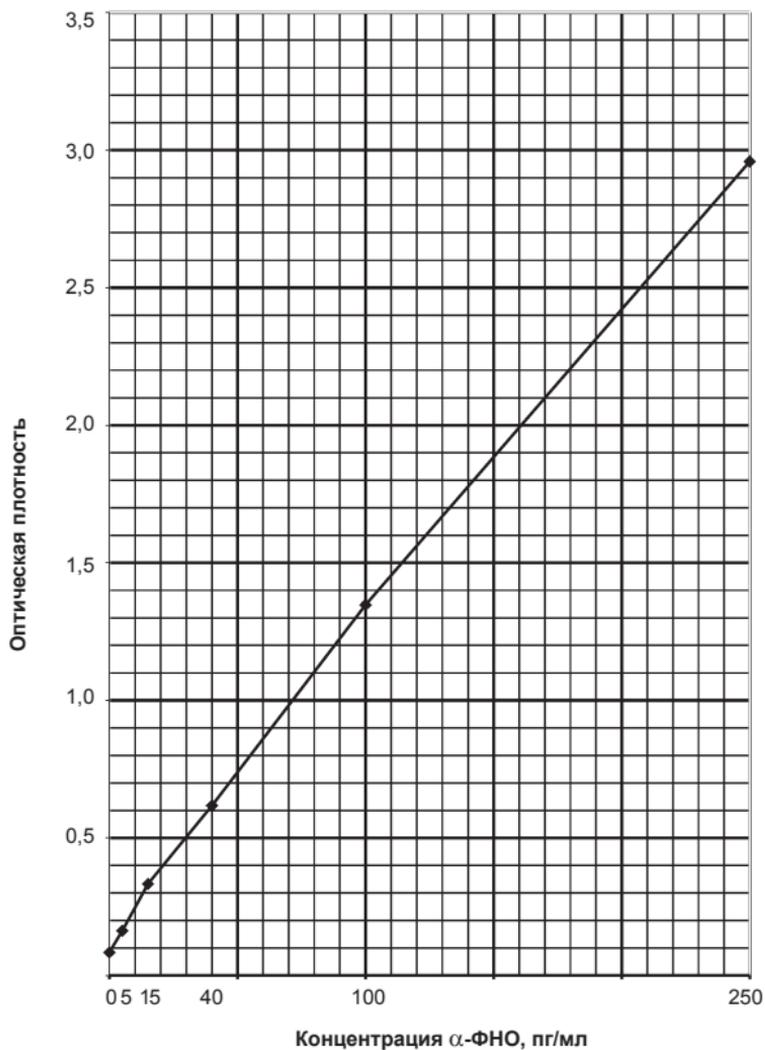


Рис. Пример зависимости оптической плотности от концентрации альфа-ФНО в калибровочных образцах.

трацию альфа-ФНО необходимо умножить на фактор разведения.

Для определения индуцированной продукции альфа-ФНО супернатанты развести культуральной средой в 10 раз (см. табл. 1).

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

## **10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА**

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

Срок годности – 18 мес. со дня выпуска.

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

**10.3.** Не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями.

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

**10.5.** *Запрещается использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.*

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

**По вопросам, касающимся качества наборов, обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:**  
630559, Новосибирская обл.,  
Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,  
тел. (383) 336-73-46,  
тел./факс (383) 332-67-49,  
e-mail: vbobtk@vector-best.ru

21.10.09





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

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

**КРУПНЕЙШИЙ В РОССИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ  
ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ  
ДИАГНОСТИКУМОВ**

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

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

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