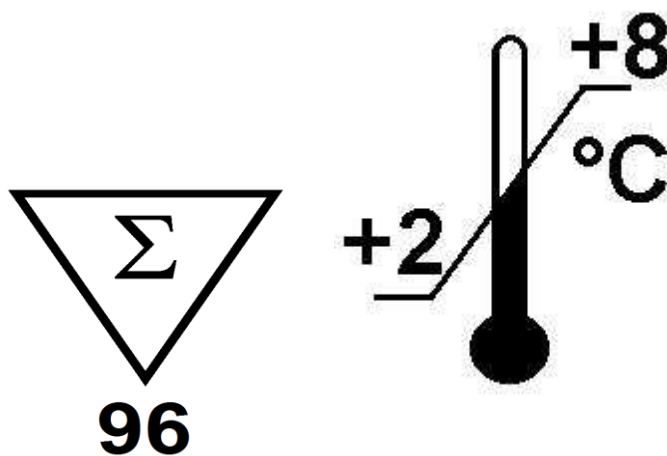


Інструкція з використання

інтерлейкін 1 бета **ІФА**

**REF IL E-3000****96**

Уповноважений представник: ТОВ «НОВАМЕДЛАЙН», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19
А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@novamedline.com, www.novamedline.com
версія 1.0 2020-07-02

ВСТУП

1. Використання за призначенням

Імуноферментний аналіз для кількісного *in vitro* визначення інтерлейкіну-1 β людини (IL-1 β) у сироватці крові та плазмі.

2. КЛІНІЧНИЙ ФОН

2.1 Біологічна активність

Інтерлейкін-1 людини (IL-1) є ключовим медіатором реакції господаря на різні інфекційні, запальні та імунологічні проблеми. Два різних поліпептиди, IL-1 α та IL-1 β , опосередковують біологічну активність IL-1 і зв'язуються з одним рецептором клітинної поверхні. Обидва спочатку синтезуються як 31-кДа внутрішньоклітинні попередники, які згодом виявляються у вигляді зрілих білків 17 кДа в супернатах моноцитів. Зв'язаний з мембраною IL-1 також описаний і може спричиняти частину місцевих ефектів, опосередкованих IL-1. Першоджерела IL-1 є моноцити крові та тканинні макрофаги. Інші спеціалізовані клітини, такі як Т- і В-лімфоцити, різні епітеліальні, ендотеліальні та деякі мезенхімальні клітини також можуть продукувати IL-1. IL-1 β є основною формою, що виділяється моноцитами та макрофагами, які, як вважають, є основним джерелом циркулюючого (плазми) IL-1.

Інгібування активності IL-1 описано в плазмі та інших біологічних рідинах. IL-1 вражає декілька незв'язаних тканин і є основним посередником "гострої фази" запальних реакцій, що характеризуються зміною метаболічних, ендокринологічних та імунологічних функцій. Цей цитокін відіграє важливу роль у Т клітинній активації, забезпечуючи один з необхідних сигналів для виробництва IL-2 (фактор росту Т-клітин). Це головний медіатор запальних процесів, діючи на нервову систему (лихоманка, сон, анорексія), на похідні клітини кісткового мозку (хемотаксис та / або активація нейтрофілів, моноцитів та лімфоцитів) та на різні тканини (проліферація фібробластів, резорбція хрящово-кісткового матриксу, проліферація гліальних клітин, стимуляція активності прокоагулянтів ендотеліальних клітин тощо). Більшість із цих видів діяльності безпосередньо пов'язані з IL-1 β , але інші опосередковуються у співпраці з іншими цитокинами, такими як IL-6, інтерферони та пухлина фактор некрозу. IL-1 стимулює вироблення або діє синергічно з цитокинами. Таким чином, біологічна активність є результатом мережі взаємодій між цими різними медіаторами.

2.2 Клінічне застосування

Біологічні властивості IL-1 β та його ключова роль у запальних процесах свідчать про його участь у патогенезі багатьох захворювань. Дійсно, велика кількість IL-1 виявляється у спільних випотах деяких пацієнтів з ревматоїдними та неревматоїдними запальними захворюваннями суглобів, з інфекційною плевральною або очеревиною рідини, а також у дренажній рідині пацієнтів, які перенесли хронічний діабет, захворювання пародонту тощо. Хоча в плазмі або сироватці крові здорової людини, яка відпочила, зазвичай виявляється мало або взагалі не виявляється IL-1 β .

Повідомлялося про підвищений рівень циркуляції у гарячкових або септичних пацієнтів, у пацієнтів з Хворобою Крона, під час відторгнення трансплантата, у здорових добровольців після тривалих фізичних навантажень та у жінок після овуляції. Дослідження, засновані на виробництві IL-1 *in vitro* ізольованими лейкоцитами крові демонструє зниження вироблення IL-1 у пацієнтів із недостатнім харчуванням та онкологічних хворих з великим навантаженням на пухлини. Отже, імунологічний аналіз на IL-1 β є важливим інструментом для вивчення активації макрофагів та дослідження ролі IL-1 β при різних (фізіологічних чи патологічних) імунних та запальних процесах.

3. ПРИНЦИПИ МЕТОДУ

ІФА IL-1 β - це твердофазний імуноферментний чутливий аналіз, проведений на мікропланшеті.

В аналізі використовуються моноклональні антитіла (MAbs), спрямовані проти різних епітопів IL-1 β .

Калібратори і зразки реагують із захоплюючими моноклональними антитілами (MAb 1), покритими на лунки мікропланшету, та з моноклональними антитілами (MAb 2), міченими пероксидазою хрому (HRP). Після інкубаційного періоду дозволяють утворення бутерброда: покритий MAb 1 - людський IL-1 β - MAb 2 - HRP, мікропланшет промивається до видалити незв'язаних ферментативно мічених антитіл. Зв'язане мічене ферментом антитіло вимірюють за допомогою хромогенної реакції. Додають хромогенний розчин (ТМБ) та інкубують. Реакцію зупиняють за допомогою додавання стоп-розчину і мікропланшет зчитується на відповідній довжині хвилі. Кількість субстрату визначається колориметрично шляхом вимірювання поглинання, яке пропорційне концентрації IL-1 β .

Будується калібрувальна крива і концентрація IL-1 β у зразках визначається інтерполяцією з калібрувальною кривою. Використання рідера ІФА (лінійність до 3 одиниць ОГ) та вдосконалений метод обробки даних (поліхроматична обробка даних) призводить до високої чутливості в низькому діапазоні та в розширеному діапазоні калібрування.

4. НАДАНИ РЕАГЕНТИ

IL E-3031 Мікропланшет - готовий до використання

Зміст: мікропланшет із 96 лунками, покритими анти IL-1 β (моноклональні антитіла)

Колір: синій

IL E-3040 Кон'югат - готовий до використання

Зміст: Кон'югат: мічений HRP анти-IL-1 β (моноклональні антитіла) в буфері TRIS-Maleatel з бичачим сироватковим альбуміном і тимолом

Об'єм: 1 x 6 мл

Код кольору: червоний

Калібратори та контролю – ліофілізовані

Каталожний номер	позначення	Калібратор/контроль
IL E-3001	CAL 0	Калібратор 0
IL E-3002	CAL 1	Калібратор 1
IL E-3003	CAL 2	Калібратор 2
IL E-3004	CAL 3	Калібратор 3
IL E-3005	CAL 4	Калібратор 4
IL E-3006	CAL 5	Калібратор 5
IL E-3051	CONTROL 1	Контроль 1
IL E-3052	CONTROL 2	Контроль 2
Вміст	Калібратори (див. Точні значення на етикетці флакона) / Контроль у сироватці крові людини, бензамідин та тимол	
Підготовка	Додати 2 мл дистильованої води	
колір	калібратор	жовтий
	контролі	срібний

IL E-3060 DILUENT Розчинник зразка - ліофілізований

Зміст: Розчинник зразка: людська сироватка, бензамідин та тимол

Обсяг: 3 флакони

Приготування: Додайте дистильовану воду (точний об'єм див. На етикетці)

Колір: чорний

Промивний розчин WASH CONC IL E-3030 - 200x концентрований

Зміст: Промивний розчин (TRIS-HCl)

Об'єм: 1 x 10 мл

Приготування: Розведіть 200x дистильованою водою (використовуйте магнітну мішалку).

Колір: коричневий

IL E-3055 SUBSTRATE Хромоген ТМБ - Готовий до використання

Зміст: Хромоген ТМБ (тетраметилбензидин)

Об'єм: 1 x 25 мл

Колір: коричневий

СТОП розчин STOP -SOLN IL E-3080 - готовий до використання

Зміст: розчин для зупинки: 1,0 н. HCl

Об'єм: 1 x 12 мл

Колір: білий



Небезпеки

ідентифікація:

H314 Викликає сильні опіки шкіри та пошкодження очей

Примітка:

1. Використовуйте розчинник для розведення зразка.
2. 1 пг препарату калібратора еквівалентний 100 мМО NIBSC 1st IS 86/680.

5. Матеріали необхідні, не надані

Наступні матеріали необхідні, але не передбачені у наборі:

1. Високоякісна дистильована вода
2. Піпетки для доставки: 50 мкл, 200 мкл, 1 мл і 10 мл (використання точних піпеток з одноразовим пластиковим наконечником рекомендується)
3. Вихровий змішувач
4. Магнітний змішувач
5. Горизонтальний шейкер для мікропланшетів з 700 об / хв $\pm$ 100 об / хв
6. Система для промивання мікропланшетів
7. Рідер мікропланшетів, здатний зчитувати при 450 нм, 490 нм та 650 нм (у випадку поліхроматичного зчитування) або здатний зчитувати при 450 нм та 650 нм (біхроматичне зчитування)

6. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

Калібратори:

Розведіть калібратори у 2 мл дистильованої води.

Контролі:

Розведіть контролі з 2 мл дистильованої води.

Розчинник зразка:

Відновіть розчинник зразка до обсягу, зазначеного на етикетці флакона, дистильованою водою.

Робочий промивний розчин:

Приготуйте достатній об'єм робочого розчину для промивання, додавши 199 об'ємів дистильованої води до 1 об'єму промивного розчину (200х). Для гомогенізації використовуйте магнітний змішувач. Видаліть невикористаний робочий розчин для промивання в кінці дня.

7. Зберігання та термін придатності реагентів

- Перед відкриттям або відновленням всі компоненти наборів стабільні до закінчення терміну придатності, зазначеного на флаконі етикетці, якщо зберігати при температурі від 2 ° С до 8 ° С.
- Невикористані стріпи слід зберігати при температурі 2 - 8 ° С у закритому пакеті, що містить осушувач, до закінчення терміну придатності.
- Після відновлення калібратори, контролі та розчинник зразка стабільні протягом 4 днів при температурі від 2 ° С до 8 ° С. Для триваліших термінів зберігання, аліквоти слід виготовляти і витримувати при -20 ° С не більше 2 місяців. Уникайте послідовних циклів заморожування.
- Концентрований промивний розчин стабільний при 18-25 ° С до закінчення терміну придатності.
- Свіжоприготовлений робочий розчин для промивання слід використовувати в той же день.
- Після першого використання кон'югат стабільний до закінчення терміну придатності, якщо його зберігати в оригінальному добре закритому флаконі при Від 2 ° С до 8 ° С.
- Зміни зовнішнього вигляду реагентів можуть свідчити про нестабільність або погіршення стану.

8. ЗБІР ЗРАЗКІВ І ПІДГОТОВКА

- Сироватку необхідно якнайшвидше видалити зі згустку еритроцитів після згортання та центрифугування, і витримувати при 4 ° С. Якщо зразки використовуються не відразу, їх слід зберігати при температурі -20 ° С не більше 2 місяців, і при -70 ° С для більш тривалого зберігання (максимум рік).
- Уникайте подальших циклів заморожування.
- Перед використанням всі зразки повинні бути при температурі 18-25 ° С. Перед використанням зразки рекомендується перемішати на вихровому міксері.
- Умови відбору проб можуть впливати на значення, тому під час відбору проб необхідно дотримуватися суворих запобіжних заходів уникати домішок, що містяться в матеріалах для відбору проб, які стимулювали б виробництво IL-1 β клітинами крові та таким чином помилково збільшують значення IL-1 β у плазмі крові.
- Пробірки для забору не повинні містити пірогену. Плазму можна збирати на стерильній ЕДТА і швидко відокремлювати після центрифугування. Не рекомендується використовувати гепаринові пробірки, оскільки партії гепарину часто є забруднені пірогенами.

9. ПРОЦЕДУРА

9.1 Поводження примітки

- Не використовуйте набір або компоненти після закінчення терміну придатності.
- Не змішуйте матеріали з різних партій наборів.
- Перед використанням доведіть всі реагенти до 18-25 ° С.
- Ретельно перемішайте всі реагенти та зразки, обережно перемішуючи або прокручуючи.
- Виконуйте калібратори, контролю та зразки у двох примірниках. Рекомендується вертикальне вирівнювання.
- Використовуйте чистий пластиковий контейнер для приготування розчину для промивання.
- Щоб уникнути перехресного забруднення, використовуйте чистий одноразовий наконечник піпетки для додавання кожного реагенту та зразку.
- Для дозування хромогенного розчину та стоп-розчину уникайте піпеток з металевими частинами.
- Високоточні піпетки або автоматизоване обладнання для піпетування покращать точність.
- Дотримуйтесь часу інкубації.
- Щоб уникнути дрейфу, час між піпетуванням першого калібратора та останнього зразка повинен бути обмежений часом, зазначеним у розділі 12.5 (Часова затримка).
- Підготуйте калібрувальну криву для кожного циклу, не використовуйте дані попередніх циклів.
- Хромогенний розчин повинен бути безбарвним. Якщо протягом декількох хвилин після приготування з'являється синій колір, це вказує на те, що реагент непридатний для використання, і його слід видалити.
- Розподіліть хромогенний розчин протягом 15 хвилин після промивання мікропланшету.
- Під час інкубації з хромогенним розчином уникайте потрапляння прямих сонячних променів на мікропланшет.

9.2. Процедура

1. Виберіть необхідну кількість стріпів для прогону. Невикористані стріпи слід повторно запечатати в пакеті за допомогою осушувача та зберігати при 2 - 8 ° С.
2. Закріпіть стріпи в утримувачі.
3. Прокачайте по 200 мкл кожного калібратора, контролю та зразка у відповідні лунки.
4. Прокачайте піпеткою 50 мкл кон'югату анти-IL-1 β -HRP у всі лунки.
5. Інкубуйте 2 години при 18-25 ° С на горизонтальному шейкері, встановленому на 700 об / хв $\pm$ 100 об / хв.
6. Аспіруйте рідину з кожної лунки.
7. Промийте планшет 3 рази, виконавши:
 - Розподіл 0,4 мл промивного розчину в кожну лунку
 - Аспірація вмісту кожної лунки
8. Прокачайте 200 мкл хромогенного розчину в кожну лунку протягом 15 хвилин після кроку промивання.
9. Інкубуйте мікропланшет протягом 15 хвилин при 18 - 25 ° С на горизонтальному шейкері, встановленому на 700 об / хв $\pm$ 100 об / хв, уникайте прямих сонячних променів.
10. Піпетуйте 100 мкл стоп-розчину в кожну лунку.
11. Прочитайте поглинання при 450 нм і 490 нм (еталонний фільтр 630 нм або 650 нм) протягом 3 годин і обчисліть результати, як описано в розділі 10.

10. РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

10.1 Поліхроматичне читання

1. У цьому випадку програмне забезпечення виконує обробку даних.
2. Планшет спочатку зчитується при 450 нм проти еталонного фільтра, встановленого на 650 нм (або 630 нм).
3. Друге зчитування проводиться при 490 нм проти того самого еталонного фільтра.
4. Програмне забезпечення буде керувати рідером автоматично і інтегруватиме обидва показання в поліхроматичну модель. Ця техніка може генерувати ОГ до 10.
5. Принцип поліхроматичної обробки даних такий:
 - X_i = ОГ при 450 нм
 - Y_i = ОГ при 490 нм
 - За допомогою стандартної незваженої лінійної регресії розраховуються параметри A & B: $Y = A * X + B$
 - Якщо $X_i < 3$ одиниці ОГ, тоді X обчислюється = X_i
 - Якщо $X_i > 3$ одиниці ОГ, тоді X обчислюється = $(Y_i - B) / A$
 - Для побудови калібрувальної кривої використовується 4-параметрова логістична крива.
 - Концентрація IL-1 β у зразках визначається інтерполяцією на калібрувальній кривій.

10.2 Біхроматичне читання

1. Зчитайте планшет при 450 нм порівняно з еталонним фільтром, встановленим на 650 нм (або 630 нм).
2. Обчисліть середнє значення повторних визначень.
3. На напівлогарифмічному або лінійному міліметровому папері будують графіки значень ОГ (ординат) для кожного калібратора проти відповідної концентрації IL-1 β (абсциса) і проведіть калібрувальну криву через точки калібратора, з'єднавши нанесені точки прямими лініями.
4. Зчитайте концентрацію для кожного контролю та зразка шляхом інтерполяції на калібрувальній кривій. 5. Скорочення даних за допомогою комп'ютера спростить ці розрахунки. Якщо використовується автоматична обробка результатів, а Рекомендується встановлення 4-параметричної кривої логістичної функції.

11. ТИПОВІ ДАНІ

Наступні дані служать лише для ілюстрації і ніколи не повинні використовуватися замість калібрувальної кривої в реальному часі .

IL-1 β ІФА		ОГ одиниці поліхроматична модель
калібратор	0 пг/мл	0,013
	24 пг/мл	0,121
	89 пг/мл	0,336
	320 пг/мл	1,042
	574 пг/мл	1,693
	1166 пг/мл	2,704

12. ВИКОНАННЯ ТА ОБМЕЖЕННЯ

12.1 Межа виявлення

Двадцять нульових калібраторів аналізували разом з набором інших калібраторів. Межа виявлення, визначена як видима концентрація двох стандартних відхилень вище середньої ОГ за нульового зв'язування становила 0,35 пг / мл.

12.2 Специфічність

Не спостерігалось значної перехресної реакції у присутності 500 нг / мл IL-1 α , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , TNF- β , IFN- β , IFN- γ , TGF- β , GM-CSF, OSM, MIP-1 α , MIP-1 β , LIF, MCP-1, G-CSF, PAHCS. Цей аналіз IL-1 β є специфічним для природного та рекомбінантного IL-1 β людини.

12.3 Точність

Між аналізами				В аналізі			
сироватка	кількість	<X> $\pm$ СВ (пг/мл)	СВ (%)	сироватка	кількість	<X> $\pm$ СВ (пг/мл)	СВ (%)
A	10	127 $\pm$ 3	2,3	A	20	127 $\pm$ 6	4,9
B	10	733 $\pm$ 11	1,4	B	20	549 $\pm$ 14	2,5

СВ: стандартне відхилення; CV: Коефіцієнт варіації

12.4 Точність

Тест на відновлення

зразок	Доданий IL-1 β (пг/мл)	Відновлений IL-1 β (пг/мл)	Відновлення (%)
сироватка	1282	1196	93
	605	542	90
	329	314	95
	157	131	84
	72	64	89
	31	28	92
плазма	1282	1208	94
	605	573	95
	329	321	97
	157	146	93
	72	67	92
	31	29	94

зразок	розведення	Терапевтична конц. (пг/мл)	Виміряна концентрація (пг/мл)
сироватка	1/1	-	1197
	1/2	598	637
	1/4	299	320
	1/8	150	164
	1/16	75	86
	1/32	37	41
плазма	1/1	-	688
	1/2	344	336
	1/4	172	172
	1/8	86	87
	1/16	43	51
	1/32	26	22
	1/64	13	9
	1/128	4	4

Зразки розбавляли розчинником для зразків.

12.5 Затримка часу між останнім калібратором та видачею зразка

Як показано далі, результати аналізу залишаються точними, навіть якщо зразок видається через 30 хвилин після додання калібраторів до покритих лунок.

	t0	10 хв	20 хв	30 хв
1	1485	1575	1553	1647
2	1123	1129	1150	1228
4	592	572	595	606
5	375	391	375	375
6	1454	1429	1438	1605
500	641	583	645	658
1000	1107	1087	1158	1158
1500	1440	1261	1399	1425

12.6 Хук – Ефект

Зразок, доданий IL-1 β до 1 мкг / мл, дає більше ОГ, ніж остання точка калібратора.

13. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

- Якщо результати, отримані для контролю 1 та / або контролю 2, не знаходяться в межах, зазначених на етикетці флакона, результати не можна використовувати, якщо не надано задовільного пояснення розбіжностей.
- При бажанні кожна лабораторія може створити власні басейни контрольних зразків, які слід зберігати замороженими в аликвотах. Контролі, що містять азид, будуть перешкоджати ферментативній реакції і не можуть бути використані.
- Критерії прийнятності різниці між результатами дублювання зразків повинні покладатися на належну Лабораторну практику
- Рекомендується регулярно аналізувати контролі як невідомі зразки для вимірювання варіабельності аналізу. Ефективність аналізу слід контролювати за допомогою таблиць контролю якості контролів
- Хорошою практикою є візуальна перевірка відповідності кривої, обраної комп'ютером.

14. ДОВІДКОВІ ІНТЕРВАЛИ

Ці значення наведені лише для орієнтації; кожна лабораторія повинна встановити свій нормальний діапазон значень. Для орієнтування середнє значення 22 нормальних зразків сироватки становило 5,4 пг / мл (СВ = 3,9), коливаючись від 0 пг / мл і 13,6 пг / мл. Це дослідження проводили на зразках очевидно здорових людей з низьким рівнем СРБ. Для орієнтування середнє значення 103 нормальної плазми становило 2,6 пг / мл (СВ = 5,3), коливаючись від 0 пг / мл до 17 пг / мл (на основі 2,5% - 97,5% процентилів). Це дослідження проводилось із зразками, зібраними строго згідно з умовами відбору проб.

15. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Безпека

Тільки для діагностики *in vitro*. Компоненти людської крові, що входять до цього набору, були протестовані європейським затвердженням та / або FDA схваленими методами та визнані негативними щодо HBsAg, анти-HCV, анти-VІІ-1 та 2. Жоден відомий метод не може запропонувати повну впевненість, що похідні крові людини не передаватимуть гепатит, СНІД чи інші інфекції. Тому поводження з реагентами, зразками сироватки або плазми повинно відповідати місцевій процедурі безпеки. Усі продукти тваринного походження та їх похідні були зібрані від здорових тварин. Бичачі компоненти походять з країн, де не повідомлялося про BSE. Тим не менше, компоненти, що містять тваринні речовини слід розглядати як потенційно інфекційні. Уникайте контакту шкіри з усіма реагентами, Стоп розчин містить HCl. У разі контакту ретельно вимити з водою. Не палити, не пити, не їсти та не застосовувати косметику в робочій зоні. Не піпетуйте через рот. Використовуйте захисні одяг та одноразові рукавички.

16. ЛІТЕРАТУРА

1. OPPENHEIM J.J. and GERY I., (1982).

Interleukin-1 is more than an interleukin.

Immunology Today, 3:113-119.

2. MIZEL S.B., (1982).

Interleukin-1 and T-cell activation.

Immunol. Rev., 63:51-71.

3. DINARELLO C.A., (1984).

Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute phase response.

N. Eng. J. Med., 311:1413-1418.

4. DINARELLO C.A., (1985).

An update on human interleukin-1: from molecular biology to clinical relevance.

J. Clin. Immunol., 5:287-297.

5. BAILLY, S. et al., (1994)

Comparative production of IL-1 β and IL-1 α by LPS-stimulated human monocytes: ELISAs measurement revisited.

Cytokine, 6:111-115.

6. DINARELLO C.A., (1988)

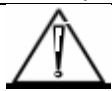
Biology of interleukin-1.

FASEB J., 2:108-115.

17. РЕЗЮМЕ ПРОТОКОЛ

	Калібратор (мкл)	Зразки/контролі (мкл)
Калібратори (0-5)	200	-
Зразки, контролю	-	200
Анти IL-1 β -HRP кон'югат	50	50
Інкубуйте 2 години при 18-25 ° С при постійному струшуванні при 700 об / хв. Аспіруйте вміст кожної лунки. Промити 3 рази 400 мкл промивного розчину і аспірувати.		
Хромогенний розчин	200	200
Інкубувати 15 хв при 18-25 °С з тривалим струшуванням при 700 об/хв		
Стоп розчин	100	100
Зчитуйте на рідері мікропланшетів і реєструйте поглинання кожної лунки при 450 нм (і 490 нм) проти 630 (або 650 нм)		

Умовні позначення:

 Температура зберігання	 Виробник	 Містить достатньо для <N> випробувань
 Дата закінчення терміну придатності	LOT Код партії	IVD Тільки для ін вітро діагностики в лабораторних умовах!
 Зверніться до інструкції по застосуванню	CONT Зміст	CE Маркування
 Обережно	REF Каталогний номер	