

НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО IL-10

BMS215/2 / BMS215/2TEN, Human IL-10 Platinum

Каталог. №: **BMS215/2/BMS215/2TEN** Методика от **09-07-2012**
 Количество: **96, 10x96** Версия **23**
 Производитель: **Bender MedSystems**
GmbH, (Австрия)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

**Только для исследовательских целей
Не для использования в диагностических или
терапевтических процедурах**

1. НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Данный набор Human IL-10 ELISA предназначен для количественного определения человеческого интерлейкина-10. Набор предназначен только для исследовательских целей и не должен использоваться в диагностике или терапевтических целях.

2. ВВЕДЕНИЕ (См. оригинал инструкции на англ. языке).

3. ПРИНЦИП ТЕСТА

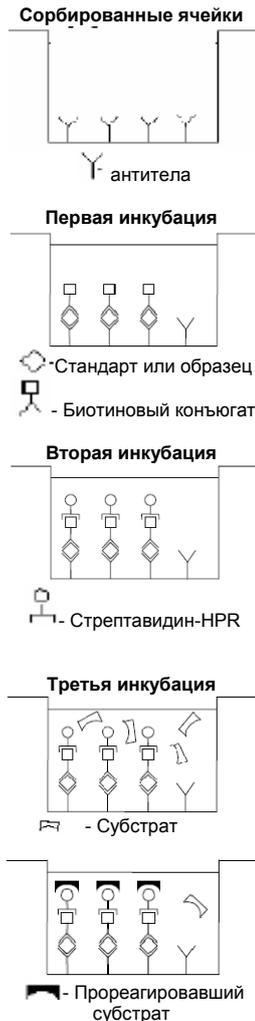
Антитела, специфичные к IL-10, сорбированы в ячейках планшета.

Человеческий IL-10 в образце или стандарте связывается с антителами в ячейках планшета. Биотиновые античеловеческие антитела IL-10 связываются с человеческими IL-10, захваченными первым антителом.

После инкубации и промывки из ячеек удаляется не связавшийся биотиновый конъюгат, и в ячейки добавляется HRP-стрептавидин, реагирующий с биотин-конъюгированным античеловеческим антителом IL-10.

После инкубации несвязанный стрептавидин-HRP удаляют во время стадии промывки и в лунки добавляется раствор субстрата, вступивший в реакцию с HRP.

Интенсивность окраски, измеренная на длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации IL-10, присутствующего в образцах или стандартах. Концентрация IL-10 в образцах определяется по стандартной кривой, построенной по 7 приготовленным разведениям стандарта.



4. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

4.1 Реагенты в наборе Human IL-10 Platinum ELISA BMS215/2 (96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к человеческому IL-10	1 планшет
Конъюгат моноклональных анти-IL-10 антител и биотина, 100 мкл	1 флакон
Конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена, 150 мкл	1 флакон
Стандарт, лиофилизированный, 400 пг/мл после восстановления	2 флакона
Контроль высокий, лиофилизированный	1 флакон
Контроль низкий, лиофилизированный	1 флакон
Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20 и 10 % BSA), 5 мл	1 флакон
Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 50 мл	1 бутылка
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл	1 флакон
Стоп-раствор (1М фосфорная кислота), 15 мл	1 флакон
Синий краситель, 0.4 мл	1 флакон
Зелёный краситель, 0.4 мл	1 флакон
Красный краситель, 0.4 мл	1 флакон
Плёнки для заклеивания стрипов	4

4.2 Реагенты в наборе Human IL-10 Platinum ELISA BMS215/2TEN (10 x 96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к человеческому IL-10	10 планшетов
Конъюгат моноклональных анти-IL-10 антител и биотина, 100 мкл	10 флаконов
Конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена, 150 мкл	10 флаконов
Стандарт, лиофилизированный, 400 пг/мл после восстановления	10 флаконов
Контроль высокий, лиофилизированный	10 флаконов
Контроль низкий, лиофилизированный	10 флаконов
Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20 и 10 % BSA), 5 мл	3 флакона
Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 50 мл	4 бутылки
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл	10 флаконов
Стоп-раствор (1М фосфорная кислота), 15 мл	10 флаконов
Синий краситель, 0.4 мл	6 флаконов
Зелёный краситель, 0.4 мл	6 флаконов
Красный краситель, 0.4 мл	6 флаконов
Плёнки для заклеивания стрипов	20

5. ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ – НАБОР ИФА

Храните компоненты набора при температуре 2-8 °С, кроме контролей. Лيوфилизированные контроли храните при -20 °С. Сразу после использования верните реагенты в холодильник. Храните до даты, указанной на упаковке реагентов.

Только при соответствующем хранении и исключении контаминации во время предыдущего использования набора гарантируется качественная работа реагентов.

6. ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА

Супернатант культур клеток, человеческая сыворотка и плазма (цитратная, гепариновая) могут быть использованы для анализа данным методом. Другие биологические образцы также могут быть использованы. Отделите сыворотку или плазму от сгустка или эритроцитов как можно быстрее.

Образцы, содержащие видимый преципитат, необходимо центрифугировать для отделения преципитата до анализа. Не используйте сильно гемолизированные или липемичные образцы.

Если образцы не будут протестированы в день сбора, то их необходимо алиquotировать, заморозить и хранить при температуре -20 °С или ниже, чтобы предотвратить потерю биоактивности IL-10. Если анализ будет выполнен в ближайшие 24 часа, образцы могут храниться при 2-8 °С.

Избегайте повторных циклов замораживания-размораживания образцов. Перед анализом, замороженный образец следует довести до комнатной температуры медленно и осторожно перемешать.

7. ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Калиброванные пипетки на 5 мл и 10 мл
- Калиброванные пипетки одноканальные переменного объема с одноразовыми наконечниками на 5 – 1000 мкл
- Многоканальные пипетки с одноразовыми наконечниками на 50 – 300 мкл
- Ванночка для реагентов для использования с многоканальной пипеткой

- Калиброванные стаканы и цилиндры, необходимые для приготовления реактивов
- Ручное или автоматическое промывающее устройство
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и, по возможности, фильтром сравнения ≥ 620 нм
- Дистиллированная или деионизированная вода
- Миллиметровая бумага или программное обеспечение для обработки результатов (линейная регрессия)

8. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

- Все химикаты считать потенциально опасными. Рекомендуется использование данных реагентов только квалифицированным персоналом в лабораторных условиях. Использовать защитную одежду, очки и перчатки. Избегать контакта с глазами и кожей. В случае контакта, промыть с большим количеством воды.
- Набор предназначен только для исследовательских целей и не должен использоваться в рутинных диагностических процедурах.
- Не смешивайте разные лоты и реагенты из разных лотов.
- Не используйте реагенты с истекшим сроком хранения.
- Избегайте облучения реагентов сильным источником света во время хранения и инкубации.
- Не пипетируйте ртом.
- Нельзя есть или курить в месте, где хранятся реагенты и образцы или в месте, где проводится анализ.
- Избегайте контакта реагентов с кожей и слизистыми.
- При ручном методе анализа пользуйтесь латексными перчатками для защиты рук.
- Избегайте контакта субстратного раствора с металлами и окислителями.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей.
- Чтобы избежать микробного загрязнения или загрязнения реактивами и получения в результате недостоверных результатов, пользуйтесь одноразовыми наконечниками.
- Используйте чистую, специально выделенную посуду для конъюгатов и субстратного раствора.
- Загрязнение кислотой инактивирует конъюгат.
- Для приготовления реактивов используйте дистиллированную или деионизированную воду.
- Субстратный раствор должен иметь комнатную температуру перед использованием
- Обеззараживайте после работы образцы, так как они могут быть инфицированы, предпочтительно автоклавированием не менее 1 часа при 121.5 °С.
- Жидкие отходы, не содержащие кислоту, и нейтрализованные необходимо смешать с раствором гипохлорита натрия таким образом, чтобы получился в итоге 1% раствор гипохлорита. Оставьте полученную смесь на 30 минут для эффективного обеззараживания. Жидкие отходы, содержащие кислоту, необходимо нейтрализовать до обеззараживания раствором гипохлорита натрия.

9. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Буферные концентраты привести к комнатной температуре и развести перед началом анализа. Если в **Буферных концентратах** образовались кристаллы, аккуратно подогреть их до полного растворения.

9.1 Промывающий раствор (1 x)

Разбавьте 50 мл концентрата дистиллированной или деионизированной водой в мерном цилиндре до конечного объема 1,0 л. Перемешайте, избегая вспенивания.

Храните Промывающий раствор при 2-25 °С. Промывающий раствор стабилен 30 дней.

Промывающий раствор (1 x) также может быть приготовлен согласно следующей таблице:

Количество используемых стрипов	Концентрат Промывающего раствора, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	25	475
1-12	50	950

9.2 Рабочий буфер (1 x)

Хорошо перемешайте концентрат Рабочего буфера. Разбавьте 5,0 мл концентрата дистиллированной водой в мерном цилиндре до конечного объема 100,0 мл. Перемешайте, избегая вспенивания. Храните Разбавитель образцов при 2-8 °С. Разбавитель образцов стабилен 30 дней.

Рабочий буфер (1x) также может быть приготовлен согласно следующей таблице:

Количество используемых стрипов	Концентрат Рабочего Буфера (20x), мл	Дистиллированная вода (мл)
1-6	2,5	47,5
1-12	5,0	95,0

9.3 Биотиновый Конъюгат

Заметьте, что Биотиновый Конъюгат должен быть использован в течение 30 минут после разведения.

Приготовьте 1:100 разбавление концентрированного раствора биотинового конъюгата с буфером для анализа (1x) в чистой пластиковой пробирке по мере необходимости в соответствии со следующей таблицей:

Количество используемых стрипов	Биотиновый конъюгат, мл	Рабочий буфер (1x) (мл)
1-6	0,03	2,97
1-12	0,06	5,94

9.4 Стрептавидин-HRP

Заметьте, что Стрептавидин-HRP должен быть использован в течение 30 минут после разведения.

Приготовьте 1:100 разбавление концентрированного раствора Стрептавидин-HRP с буфером для анализа (1x) в чистой пластиковой пробирке по мере необходимости в соответствии со следующей таблицей:

Количество используемых стрипов	Стрептавидин-HRP, мл	Рабочий буфер (1x) (мл)
1-6	0,06	5,94
1-12	0,12	11,88

9.5 Стандарт человеческого IL-10

Растворите Стандарт IL-10 в дистиллированной воде. Необходимый объем для растворения указан на этикетке флакона, содержащего стандарт. Осторожно перемешивайте до полного растворения. Конечная концентрация полученного раствора составит 400 пг/мл. Оставить стандарт для восстановления на 10-30 минут. Тщательно перемешать перед разведением.

После использования оставшийся стандарт не может храниться и должен быть выброшен.

Разведения стандарта могут производиться непосредственно на планшете (см. пункт 10с) или альтернативно в пробирках (см. Пункт 9.5.1)

9.5.1 Внешнее разведение Стандарта

Пометить 7 пробирок, одну для каждой точки стандарта. S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7.

Затем подготовить серийные разведения 1:2 для стандартной кривой как указано ниже:

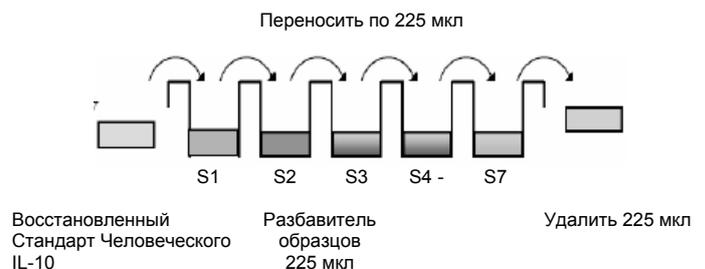
Пипетировать 225 мкл Рабочего Буфера в каждую пробирку.

Пипетировать 225 мкл восстановленного стандарта (концентрация стандарта = 400 пг/мл) в первую пробирку, помеченную S1, и перемешать (концентрация стандарта 1 = 200 пг/мл).

Пипетировать 225 мкл этого раствора во вторую пробирку, помеченную S2, и тщательно перемешать перед следующим перемещением.

Повторить серийные разведения еще 5 раз, таким образом формируя точки стандартной кривой (См. рисунок ниже).

Разбавитель образцов служит в качестве бланка.



9.6 Контроли

Восстановить путем добавления 300 мкл дистиллированной воды к лиофилизированным **контролям** (10-30 минут). Аккуратно перемешать, чтобы обеспечить полное и однородное растворение. В дальнейшем обращайтесь с контролями как с образцами в анализе. За данными относительно контрольного диапазона значений обратитесь к сертификату анализа или этикетке флакона. Хранить восстановленные контроли аликвотированными при -20 °С. Избегайте циклов повторного замораживания и оттаивания.

9.7 Добавление окрашивающих реагентов: синего, зеленого, красного

Для исключения ошибок в пипетировании при работе с иммуноферментными наборами фирма Bender MedSystems теперь предлагает дополнительное средство для контроля пипетирования даже очень маленьких объемов реагентов – каждый реагент будет отличаться от других цветом.

Эта процедура **необязательна**, она не влияет на результаты анализа и предназначена для облегчения работы лаборанта, поэтому можно этот шаг инструкции пропустить (не выполнять).

Альтернативно, можно использовать основные растворы красителей (синий, зелёный, красный), добавляя их к соответствующему реагенту согласно протоколу (смотри Таблицы ниже).

1. Разбавитель образцов: перед разбавлением стандарта или образца добавьте **синий краситель** в соотношении 1:250 (См. Таблицу) в рабочий раствор **Разбавителя образцов** (1х) и выполняйте дальше исследование, следуя инструкции.

5 мл Рабочего Буфера (1х)	20 мкл Синего красителя
12 мл Рабочего Буфера (1х)	48 мкл Синего красителя
50 мл Рабочего Буфера (1х)	200 мкл Синего красителя

2. Биотин-Конъюгат: перед разбавлением концентрата биотинового конъюгата добавьте **зелёный краситель** в соотношении 1:100 (смотри таблицу) к Рабочему буферу (1х), используемому для разбавления конъюгата, окрашенный биотиновый конъюгат используйте согласно инструкции.

3 мл Рабочего буфера (1х)	30 мкл Зеленого красителя
6 мл Рабочего буфера (1х)	60 мкл Зеленого красителя

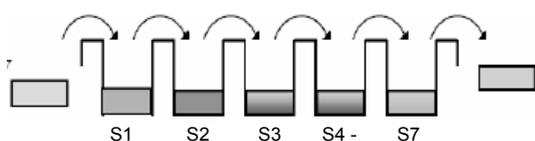
3. Стрептавидин-HRP: перед разбавлением концентрата HRP-стрептавидаина добавьте **красный краситель** в соотношении 1:250 (смотри таблицу) к Рабочему буферу (1х), используемому для разбавления конъюгата, окрашенный HRP-стрептавидин используйте согласно инструкции.

6 мл Рабочего буфера (1х)	24 мкл Красного красителя
12 мл Рабочего буфера (1х)	48 мкл Красного красителя

10. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

- Определить количество микролучных стрипов, необходимых для проверки требуемого количества образцов плюс соответствующее количество лунок, необходимых для бланков и стандартов. Каждый образец, стандарт, бланк и дополнительные контрольные образцы должны быть проанализированы в двух экземплярах. Удалите лишние микрострипы из держателя и храните их в пакете из фольги с осушителем при 2-8 °С плотно закрытыми.
- Промойте ячейки 2 раза 400 мкл **Промывочного Буфера** на лунку, полностью удаляя жидкость между промывками. Оставить на **10-15 секунд**. Избегайте царапин на поверхности ячеек. Стряхните планшет на фильтровальной бумаге после последней промывки. Используйте стрипы немедленно после стряхивания или максимум через 15 минут при условии, что стрипы уложены на влажную фильтровальную бумагу в перевернутом виде. **Не позволяйте ячейкам высыхать!**
- Разведение стандарта на планшете** (альтернативно разбавление стандарта может быть приготовлено в пробирках – см. 9.5.1): Добавить 100 мкл Разбавителя для образцов в дублях ко всем **стандартам**. Приготовьте стандартные разведения добавлением по 100 мкл разбавленного **Стандарта** (раздел «Приготовление реагентов» 9.5) в ячейки A1 и A2 в дублях (См. табл. 1). Перемешайте содержимое ячеек A1 и A2 и перенесите по 100 мкл раствора из ячеек A1 и A2 в ячейки B1 и B2 соответственно. Во время этих манипуляций постарайтесь не поцарапать внутреннюю поверхность ячеек. Повторите перенос и разведение стандартов 5 раз, получив в итоге 2 ряда разведений **Стандарта IL-10** в диапазоне от 200.0 до 3.1 пг/мл. Удалите и выбросьте 100 мкл жидкости из последних ячеек (G1, G2).

Переносить по 100 мкл



Восстановленный
Стандарт Человеческого
IL-10

Разбавитель
образцов
100 мкл

Удалить 100 мкл

При **внешнем разведении стандарта** пипетировать 100 мкл этих разведений стандартов (S1-S7) в лунки для стандартов согласно таблице 1.

Таблица 1: Схема расположения образцов, бланка и стандартов на планшете.

	1	2	3	4
A	Ст #1 (200.0 пг/мл)	Ст #1 (200.0 пг/мл)	O 1	O 1
B	Ст #2 (100.0 пг/мл)	Ст #2 (100.0 пг/мл)	O 2	O 2
C	Ст #3 (50.0 пг/мл)	Ст #3 (50.0 пг/мл)	O 3	O 3
D	Ст #4 (25.0 пг/мл)	Ст #4 (25.0 пг/мл)	O 4	O 4
E	Ст #5 (12.5 пг/мл)	Ст #5 (12.5 пг/мл)	O 5	O 5
F	Ст #6 (6.3 пг/мл)	Ст #6 (6.3 пг/мл)	O 6	O 6
G	Ст #7 (3.1 пг/мл)	Ст #7 (3.1 пг/мл)	O 7	O 7
H	Бланк	Бланк	O 8	O 8

Ст – Стандарт, O – образец

- Внесите по 100 мкл **Рабочего Буфера** в дубликаты в ячейки «Бланк».
- Внесите по 50 мкл **Рабочего Буфера** в ячейки, предназначенные для образцов.
- Внесите по 50 мкл каждого **образца** в дублях в соответствующие ячейки.
- Приготовьте **Биотиновый конъюгат** (раздел «Приготовление реагентов»).
- Добавьте по 50 мкл **Биотинового конъюгата** во все ячейки.
- Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18–25 °С), если возможно, используйте орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин.
- Подготовьте **Стрептавидин-HRP** (см. раздел 9.4 Подготовка стрептавидин-HRP).
- Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек аспирацией или декантированием (сливом). Промойте ячейки 3 раза как указано в шаге «b» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- Внесите по 100 мкл разбавленного **Стрептавидин-HRP** во все ячейки, включая бланк.
- Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (18–25 °С), если возможно, используйте орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин.
- Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек аспирацией или декантированием (сливом). **Промойте** ячейки 3 раза как указано в шаге «b» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- Внесите 100 мкл **раствора субстрата ТМБ** во все лунки.
- Инкубируйте при комнатной температуре в течение примерно 10 минут. Избегайте воздействия прямых солнечных лучей.

Развитие цвета на пластине должно контролироваться и реакции с субстратом останавливается (см. следующий пункт этого протокола), прежде чем положительные лунки больше не фиксируются должным образом.

Определение идеального периода времени для развития окраски должно быть сделано индивидуально для каждого анализа.

Рекомендуется добавление стоп раствора, когда наивысший стандарт достиг темно-синего цвета. Реакция должна быть остановлена, как только Стандарт 1 достиг значения ОП 0.9 – 0.95.

- Добавьте по 100 мкл **стоп-раствора** во все ячейки, включая «Бланк», чтобы полностью инактивировать фермент в ячейках. Важно вносить стоп-реагент быстро и с той же скоростью, что и субстратный раствор. Оптическую плотность считайте немедленно после внесения стоп-реагента или в течение 1 часа при условии, что стрипы находились всё это время при температуре 2-8 °С в темноте.
- Определите оптическую плотность всех ячеек при 450 нм, желательно использовать длину волны сравнения 620 нм (допустима длина волны сравнения в диапазоне 610-650 нм). Бланкируйте микропланшетный ридер согласно руководству производителя, используя ячейки «Бланк». Определите ОП как в ячейках, содержащих образцы, так и в ячейках, содержащих разведение стандарта IL-10.

Замечание: если инкубация проводилась без встряхивания, значения могут быть ниже, чем в примере, приведённом ниже. Тем не менее, эти результаты также считаются достоверными.

11. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Рассчитайте результаты. Для этого рассчитайте среднее значение поглощения для каждого стандарта и образца. Отклонение от среднего не должно быть более 20%.
- Используя графическую бумагу, отметьте точки считанных значений поглощения стандартов на вертикальную ось Y, а соответствующие концентрации IL-10. на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую по точкам.
- Определите концентрации IL-10. в образцах из стандартной кривой. Для этого найдите значение на оси ординат (Y) соответствующее среднему значению полученной для каждого образца ОП и проведите горизонтальную линию до пересечения со стандартной кривой. Затем из точки пересечения проведите вертикальную линию до пересечения с осью абсцисс (X). Значение на оси X в точке пересечения и будет соответствовать концентрации IL-10. в соответствующей пробе.
- **В ходе анализа, согласно данной инструкции, образцы были разведены 1:2, следовательно, концентрации, полученные из калибровочной кривой, должны быть умножены на коэффициент разведения (x2).**
- **Замечание: расчёт образцов с оптической плотностью выше значения Стандарта 1 может быть некорректен – результаты будут занижаться. Такие образцы необходимо дополнительно развести буфером для разведения и протестировать еще раз, для получения результата, отражающего точную концентрацию IL-10.**
- Подразумевается, что в каждую серию анализа включается контрольный образец с известной концентрацией IL-10. Если значения контроля не укладываются в ожидаемый диапазон, результаты анализа могут быть недостоверны.
- Пример стандартной кривой показан на Рисунке ниже. Не используйте эту стандартную кривую для расчёта ваших образцов. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.

Рисунок. Пример стандартной кривой для IL-10. IL-10 был разбавлен в серии двукратных последовательных шагов титрования Разбавителем образцов. Здесь представлены средние значения из трех параллельных титрований.

Не используйте эту стандартную кривую для расчёта ваших образцов. Стандартная кривая должна быть включена в каждую постановку.

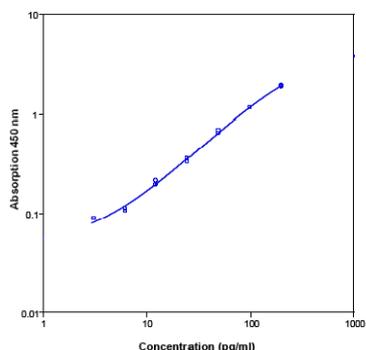


Таблица: Типичные результаты, полученные с использованием данного набора.

Измерение на 450 нм, длина волны сравнения 620 нм.

Стандарт	IL-10, пг/мл	ОП (450 нм)	ОП, среднее	CV, %
1	100.0	1.863 1.894	1.879	0.8
2	100.0	1.157 1.141	1.149	0.7
3	50.0	0.646 0.686	0.666	3.0
4	25.0	0.359 0.330	0.345	4.2
5	12.5	0.193 0.214	0.204	5.2
6	6.3	0.113 0.106	0.110	3.2
7	3.1	0.088 0.088	0.088	0.0
Бланк	0.0	0.019 0.021	0.020	5.0

ОП, полученные для стандартов, могут меняться в зависимости от условий выполнения анализа (например, температурный режим). Кроме того, на протяжении срока годности набора энзиматическая активность, и, следовательно, интенсивность окрашивания, могут изменяться. При этом результаты тестирования остаются достоверными.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Так как условия могут меняться от анализа к анализу, стандартная кривая должна быть включена в каждую серию анализа.
- Бактериальное или грибковое загрязнение образцов или реактивов может привести к недостоверным результатам.
- Используйте одноразовые наконечники.
- Стеклопосуда должна быть тщательно вымыта.
- Неполная промывка негативно влияет на точность результатов. Полностью удалите Промывочный буфер из ячеек между циклами промывки. Не позволяйте ячейкам высыхать между шагами анализа.
- Использование радиоиммунотерапии значительно увеличило число пациентов с человеческими антимышиными IgG (НАМА). НАМА могут интерферировать в анализе, используя мышинные моноклональные антитела, приводя к ложно положительным и ложно отрицательным результатам. Образцы сыворотки, содержащие антитела к мышинным иммуноглобулинам, могут быть проанализированы в случае, когда мышинные иммуноглобулины (сыворотка, асцитная жидкость или моноклональные антитела другой специфичности) добавляются к Разбавителю образцов.

13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1 Чувствительность

Минимально определяемая концентрация IL-10, определенная как концентрация аналита, дающая ОП значительно выше, чем буфер для разведения (среднее плюс 2 стандартных отклонения), составила 1.0 пг/мл (среднее 6 независимых определений).

13.2 Воспроизводимость

13.2.1 Воспроизводимость внутри одной серии

Воспроизводимость внутри одной серии определялась в 3 независимых сериях анализа. В каждой серии анализа было выполнено по 6 определений каждого из 5 образцов сывороток, содержащих различные концентрации IL-10. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения IL-10 и коэффициент вариации для каждого образца. Коэффициент вариации составил в среднем 3.2 %.

Таблица 3: Среднее значение концентрации и коэффициент вариации для каждого образца

Sample	Experiment	Mean Human IL-10 Concentration (pg/ml)	Coefficient of Variation (%)
1	1	197	0.7
	2	189	5.6
	3	207	1.1
2	1	112	2.0
	2	101	6.6
	3	101	3.1
3	1	45	1.9
	2	46	0.7
	3	45	3.6
4	1	26	1.9
	2	25	2.2
	3	23	4.3
5	1	16	10.1
	2	18	1.2
	3	15	2.6

13.2.2 Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями в одной лаборатории определялась в 3-х независимых сериях анализа тремя разными лаборантами. В каждый серии анализа было выполнено по 6 определений каждого из 5 образцов сыворотки, содержащих различные концентрации IL-10. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения IL-10 и коэффициент вариации для каждого образца, рассчитанный из 18 определений каждого образца. Коэффициент вариации составил в среднем 5.6 %.

Таблица 4: Среднее значение концентрации и коэффициент вариации каждого образца

Образец	Среднее значение концентрации, пг/мл	Коэффициент вариации, %
1	198	4.6
2	105	6.1
3	46	1.6

4	25	6.2
5	16	9.5

13.3 Извлечение

Извлечение оценивали тестируя образцы человеческой сыворотки, обогащенные 4 различными уровнями IL-10 человека. Извлечение определяли в трех независимых экспериментах в 4 образцах сывороток. Количество эндогенного IL-10 в не обогащенной сыворотке использовали как бланк в данных экспериментах. Извлечение составило 81 % - 106% или в среднем 97 %.

13.4. Линейность

4 образца человеческой сыворотки, с различными уровнями IL-10, были проанализированы в 2 сериях двукратных разведений, по 4 повтора каждого. В таблице приведены значения извлечения (% от ожидаемого значения). Показано, что извлечение в среднем составило 107%, в диапазоне от 91 % до 115 %.

Таблица 5

Sample	Dilution	Expected Human IL-10 Concentration (pg/ml)	Observed Human IL-10 Concentration (pg/ml)	Recovery of Expected Human IL-10 Concentration (%)
1	1:2	--	2611	--
	1:4	1305	1276	98
	1:8	838	731	115
	1:16	366	380	104
2	1:2	--	1256	--
	1:4	627	662	106
	1:8	332	368	111
	1:16	184	168	91
3	1:2	--	956	--
	1:4	478	552	116
	1:8	276	301	109
	1:16	150	155	103
4	1:2	--	264	--
	1:4	132	144	109
	1:8	72	82	114
	1:16	41	45	111

13.5 Стабильность образцов

13.5.1 Стабильность при замораживании-размораживании

Аликвоты сыворотки (без добавленного IL-10 и с добавлением IL-10) хранились при температуре -20 °C и размораживались 5 раз, после чего определялись уровни IL-10. Не наблюдалось значительных потерь иммунореактивности IL-10.

13.5.2 Стабильность при хранении

Аликвоты сыворотки (без добавленного IL-10 и с добавлением IL-10) хранились при температуре -20 °C, 2-8 °C, комнатной температуре и при 37 °C в течение 24 часов, после чего определялись уровни IL-10. Не наблюдалось значительных потерь иммунореактивности IL-10 при хранении при -20 °C, 2-8 °C, комнатной температуре. Значительная потеря иммунореактивности человеческого IL-10 (30%) была обнаружена во время хранения при 37 °C, после 24 ч.

13.6 Сравнение сыворотки и плазмы

У 2 индивидуумов сравнивались концентрации IL-10 в сыворотке и плазме, стабилизированной цитратом и гепарином. Существенных различий в уровнях IL-10 в определяемых образцах не наблюдалось, следовательно, все эти образцы пригодны для анализа. Однако настоятельно рекомендуется использовать однородные образцы для унификации исследований.

13.7 Специфичность

Интерференция циркулирующих факторов иммунной системы оценивали насыщением этих белков в физиологически значимых концентрациях человеческой IL-10 положительной сыворотки. Перекрестную реактивность не наблюдали ни для одного из исследованных белков.

13.8 Ожидаемые значения

Панель из 40 сывороток, а также цитратной и гепариновой плазмы из случайно выбранных здоровых доноров (мужчины и женщины) были испытаны на человеческий IL-10. Измеренные уровни могут изменяться в зависимости от используемого отбора проб. Для обнаруженных уровней человеческого IL-10 см. таблицу 6.

Sample Matrix	Number of Samples Evaluated	Range (pg/ml)	% Detectable	Mean of Detectable (pg/ml)
Serum	40	7.9– 12.9	10.0	9.6
Plasma (Citrate)	40	nd*	0	--
Plasma (Heparin)	40	8.1 – 12.5	5.0	10.3

13.9 Калибровка

Данный метод прокалиброван по высококачественному препарату рекомбинантного IL-10, количественная оценка которого, в свою очередь, была выполнена по Международному Референсному Стандарту NIBSC 93/722 и было показано, что они эквивалентны. Стандарт NIBSC 93/722 измеряется в Международных Единицах (IU), 1IU соответствует 200 пг IL-10.

15. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ)

(См. оригинал инструкции).

16. ПРОТОКОЛ ТЕСТА (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ) (См. оригинал инструкции).



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com