

# НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕРЛЕЙКІНУ-6

## Interleukin-6 (IL-6) Test System

Кат. №: 13225-300A

Дата випуску інструкції: 07-02-2022

Версія



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

### 1.0 ВВЕДЕННЯ

Призначення: Кількісне визначення концентрації Інтерлейкіну-6 в сироватці або плазмі людини за допомогою імуноферментного мікропланшетного аналізу, колориметричного.

### 2.0 РЕЗЮМЕ ТА ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ

Інтерлейкін-6 (IL-6) є цитокіном, який бере участь як у прозапальних, так і в протизапальних біологічних процесах.<sup>1</sup> Інтерлейкін-6 синтезується в організмі, як правило, у відповідь на локальне пошкодження тканин і на початковій стадії запалення. Продукування Інтерлейкіну-6 індукуює подальший синтез інших білків гострої фази, включаючи С-реактивний білок (СРБ), сироватковий амілоїд А (SAA), фібриноген, гаптоглобін та  $\alpha$  1-антихімотрипсин. І навпаки, Інтерлейкін-6 зменшує вироблення фібрoneктину, альбуміну та трансферину.<sup>2</sup> Скринінг на циркулюючий Інтерлейкін-6 в основному використовується для оцінки тяжкості системного запалення та інфекцій. Підвищений рівень Інтерлейкіну-6 може викликати важкі хронічні запальні стани через утворення амілоїду А.<sup>3</sup> Оскільки Інтерлейкін-6 також регулює транспорт заліза та цинку, хронічне запалення, що характеризується підвищеним рівнем Інтерлейкіну-6, викликає гіпоферемію, анемію та гіпоцинкемію.<sup>2</sup>

Інтерлейкін-6 також має важливе значення для зв'язку між вродженою та набутою імунною відповіддю шляхом сприяння специфічній диференціації наївних CD4<sup>+</sup> Т-клітин і диференціації Т-фолікулярних клітин-хелперів.<sup>2</sup> Однак надлишок Інтерлейкіну-6 систематично пов'язаний з багатьма аутоімунними захворюваннями через індукцію В-клітин у плазматичні клітини, що виробляють антитіла, і, отже, гіпергамглобулінемію та вироблення аутоантитіл.

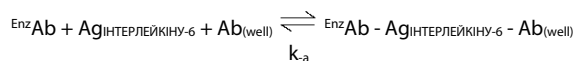
Останнім часом дослідження на сироватковий Інтерлейкін-6 стало надзвичайно важливим для визначення тяжкості COVID-19 у госпіталізованих пацієнтів. Дослідження (n=89) у 2020 році визначило, що рівень Інтерлейкіну-6, що перевищує 35 пг/мл (pg/ml), правильно передбачав ризик дихальної недостатності у пацієнтів з COVID-19 (84% чутливість, 63% специфічність). Крім того, специфічність цього прогнозу була покращена шляхом збільшення граничного значення Інтерлейкіну-6 до 80 нг/мл (ng/ml) (74% чутливості, 83% специфічності).<sup>4</sup> Отже, сироватковий Інтерлейкін-6 є цінним маркером, який можна використовувати для посилення лікування у пацієнтів із гіперзапальним синдромом, пов'язаним із COVID-19.

### 3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

#### Метод рівноваги типу «сандвіч» (ТИП 2):

Основні реагенти, необхідні для імуноферментометричного аналізу, включають антитіла високої спорідненості та специфічності (ферментні та іммобілізовані), з різним і чітким розпізнаванням епітопів, у надлишку, та нативний антиген. У цій процедурі іммобілізація відбувається під час аналізу на поверхні лунки мікропланшета шляхом взаємодії антитіла х-Інтерлейкін-6, нанесеного в лунку.

При змішуванні міченого ферментом х-ІНТЕРЛЕЙКІНУ-6 антитіла (окремий епітоп) і сироватки, що містить нативний антиген, виникає реакція між нативним антигеном і антитілами без конкуренції або стерильних перешкод з утворенням сандвіч-комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{Ab}_{(\text{well})}$  = Антитіла, нанесені в лунці (надлишкова кількість)

$\text{Ag}_{\text{ІНТЕРЛЕЙКІНУ-6}}$  = Нативний антиген (змінна кількість)

$\text{EnzAb}$  = Антитіла, мічені ферментом (надлишкова кількість)

$\text{EnzAb} - \text{Ag}_{\text{ІНТЕРЛЕЙКІНУ-6}} - \text{Ab}_{(\text{well})}$  = Сандвіч-комплекс антиген-антитіло

$k_a$  = константа швидкості асоціації

$k_{-a}$  = константа швидкості дисоціації

Через достатній проміжок часу фракцію, зв'язану з антитілами, відокремлюють від нез'язаного антигену шляхом декантації або аспірації. Ферментна активність у зв'язаній з антитілом фракції прямо пропорційна концентрації нативного антигену. Використовуючи кілька різних сироваткових референсів з відомими значеннями антигену, можна створити криву доза-відповідь, на основі якої можна визначити концентрацію невідомого антигену.

### 4.0 РЕАГЕНТИ

#### Матеріали, що постачаються:

#### A. Калібратори Інтерлейкіну-6 - 1.0 мл (мл)/флакон - Значки [A - F]

Шість (6) флаконів референсного матеріалу для Інтерлейкіну-6 з рівнями 0 (A), 10 (B), 50 (C), 125 (D), 300 (E) та 1000 (F) пг/мл (pg/ml). Зберігати при температурі 2-8 °C (°C). Додано консервант.

**Примітка:** Калібратори на основі людської сироватки були відкалібровані за допомогою референсного препарату та простежуються за кодом NIBSC 89/548.

#### B. Контролі Інтерлейкіну-6 - 1.0 мл (мл)/флакон - Значки [M&N]

Два (2) флакони референсного контролю для Інтерлейкіну-6. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C). Додано консервант.

#### C. Ферментний реагент Інтерлейкіну-6 - 6 мл (мл)/флакон - Значок

Один (1) флакон, що містить реагент кон'югату анти-Інтерлейкіну-6. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

#### D. Планшет, покритий антитілами Інтерлейкіну-6 - 96 лунок - Значок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий антитілом х-Інтерлейкіну-6. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

#### E. Концентрат промивного розчину - 20 мл (мл)/флакон - Значок

Один (1) флакон, що містить сурфактант у забуференому сольовому розчині. Додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C). Див. Розділ Приготування реагентів.

#### F. Реагент Субстрату - 12 мл (мл)/флакон - Значок S<sup>N</sup>

Один (1) флакон, що містить тетраметилбензидин (ТМВ) і перекис водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) у буфері. Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

#### G. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон - Значок

Один (1) флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при температурі 2-8 °C (°C).

#### H. Інструкція щодо продукту.

**Зауваження 1:** Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

**Зауваження 2:** Не надавайте реактиви впливу тепла, сонця або сильного світла.

**Зауваження 3:** Всі реагенти призначені для формату одного 96-лункового планшета.

#### 4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Дозатор, здатний подавати об'єми 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) та 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
2. Диспенсер(и) для повторних подач об'ємом 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) та 0.350 мл (мл) (350 мкл (μl)) з точністю, що перевищує 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Пластикові плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контрольні матеріали.

### 5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки для діагностики in vitro**

**Не для внутрішнього або зовнішнього використання на людях або тваринах**

Всі продукти, що містять сироватку, протестовані методами, схваленими FDA, не реагують на поверхневий антиген гепатиту В, антитіла до ВІЛ 1 і 2 та HCV. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з

потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2nd Edition, 1988, HHS Publication No. (CDC) 88-8395.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна відповідати вимогам місцевої регуляторної та нормативної бази.

## 6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками повинна бути сироватка або плазма крові за типом, і слід дотримуватися звичайних запобіжних заходів при заборі зразків венепункцією. Для точного порівняння з встановленими нормальними значеннями слід взяти зразок ранкової сироватки натще. Кров слід збирати в звичайну пробірку для венепункції з червоним ковпачком без добавок або антикоагулянтів для сироватки чи пробірки, що містять ЕДТА/гепарин, для плазми. Дайте крові згорнути для зразків сироватки. Центрифугуйте зразок, щоб відокремити сироватку або плазму від клітин.

Якщо зразок(и) неможливо проаналізувати відразу після забору крові, зразок(и) можна зберігати при температурі 2-8 °C (°C) до семи (7) днів або -20 °C (°C) до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторного заморожування та розморожування (максимум два цикли заморожування/розморожування перед використанням). При аналізі в двох примірниках потрібно 0.100 мл(мл) (100 мкл (μl)) зразка.

## 7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролю на рівнях у низькому, нормальному та підвищеному діапазоні для моніторингу результатів аналізу. Ці контроли повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що поставляються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

## 8.0 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

### 1. Промивний розчин

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл (мл) дистильованою або деіонізованою водою у відповідному контейнері для зберігання. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C (°C)) до 60 днів.

*Примітка 1: Не використовуйте реагенти, які забруднені або мають бактеріальний ріст.*

## 9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, сироваткові референсні калібратори і контроли повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C (°C)).

*\*\*Процедура тестування повинна проводитись кваліфікованим фахівцем\*\**

- Відформатуйте лунки мікропланшетів для кожного сироваткового референсного калібратора, контролю та зразка пацієнта для аналізу у двох примірниках. Поверніть невикористані смужки назад в алюмінієвий пакет, закрийте та зберігайте при температурі 2-8 °C (°C).
- Внесіть по 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) відповідного сироваткового референсного калібратора, контролю та зразка пацієнта у відповідні лунки.
- Додайте 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) Ферментного реагенту Інтерлейкіну-6 в усі лунки. Дуже важливо вносити всі реагенти близько до дна лунки з покриттям.
- Закрийте та обережно струшуйте мікропланшет протягом 20-30 секунд для змішування. Інкубуйте 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст мікропланшета шляхом декантації або аспірації. Якщо це декантація, постукайте та протріть планшет насухо абсорбуючим папером.
- Додайте 0.350 мл (мл) (350 мкл (μl)) промивного буфера (див. розділ «Приготування реагентів») і видаліть його. Повторіть процедуру ще чотири рази (загальна кількість циклів промивки - 5). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується пляшка під тиском, наповнити кожну лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 4 рази.

- Додайте 0.100 мл (мл) (100 мкл (μl)) ТМБ субстрату у всі лунки. **Завжди додавайте реагенти в однаковому порядку, щоб мінімізувати різницю в часі реакції між лунками.**

### НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте при кімнатній температурі протягом двадцяти (20) хвилин.
- Додайте 0.050 мл (мл) (50 мкл (μl)) стоп-розчину в кожну лунку та обережно перемішуйте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в однаковому порядку, щоб мінімізувати різницю в часі реакції між лунками.
- Виміряйте величини абсорбції кожної лунки на довжині хвилі 450 нм (nm) (вимірювання проводить при референсній довжині хвилі 630 нм (nm)). Виміри повинні бути проведені протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину.

Примітка: для повторного аналізу зразків із концентраціями понад 1000 пг/мл (pg/ml) розведення слід виконати з використанням сироватки або плазми людини з низькими значеннями Інтерлейкіну-6 і відповідно помножити на коефіцієнт розведення.

## 10.0 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для визначення концентрації Інтерлейкіну-6 в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Відкладіть значення абсорбції для кожного сироваткового референсного матеріалу в дублях відповідно до концентрації Інтерлейкіну-6 в пг/мл (pg/ml) на лінійному міліметровому папері (перед тим, як складати графік, не слід виводити середнє значення дублікатів референсного матеріалу сироватки).
- Накресліть криву, яка найкраще підходить, через побудовані точки.
- Щоб визначити концентрацію Інтерлейкіну-6 для невідомого, знайдіть середнє поглинання дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій і зчитуйте концентрацію (у пг/мл (pg/ml)) з горизонтальної осі графіка (для дублікатів невідомого можуть бути виведені середні значення, як зазначено). У наступному прикладі середня абсорбція (0.299) перетинає криву реакції на дозу при концентрації Інтерлейкіну-6 1.33 пг/мл (pg/ml) (див. Малюнок 1).

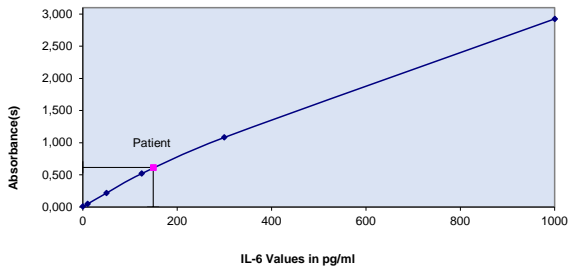
**Примітка:** Комп'ютерне програмне забезпечення для аналізу даних, розроблене для аналізів ІФА, також може використовуватися. Якщо таке програмне забезпечення використовується, слід виконати його перевірку.

Приклад 1

ID Зразка	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Значення (пг/мл (pg/ml))
Калібратор А	A1	0.008	0.009	0
	B1	0.010		
Калібратор В	C1	0.048	0.048	10
	D1	0.048		
Калібратор С	E1	0.210	0.216	50
	F1	0.221		
Калібратор D	G1	0.511	0.520	125
	H1	0.529		
Калібратор E	A2	1.068	1.082	300
	B2	1.096		
Калібратор F	C2	2.910	2.925	1000
	D2	2.940		
Пацієнт	E2	0.604	0.618	149
	F2	0.632		

\*Дані, наведені в Прикладі 1 та на Малюнку 1, служать лише для ілюстрації і **не повинні** використовуватися замість кривої реакції на дозу, підготовленої для кожного аналізу.

Малюнок 1



Absorbance(s) - Абсорбція(-ї)

Patient - Пацієнт

IL-6 Values in pg/ml - Значення Інтерлейкіну-6 в пг/мл

## 11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Максимальна Оптична щільність (Калібратор «F»)  $\geq 1.3$ .
2. Чотири з шести контрольних пулів повинні укладатися у встановлені інтервали.

## 12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

Форма MSDS та аналізу ризиків для цього продукту доступна за запитом від Monobind Inc.

### 12.1. Якість роботи набору

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції був однаковим в кожній лунці.
2. Дозування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від інструкції з використання Monobind можуть призводити до невірних результатів.
10. Дотримуйтесь всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи набору.
11. Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, дозаторів, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
12. Аналіз ризиків - згідно з вимогами Директиви 98/79/ЄС IV Маркування IVD - для цього та інших пристроїв, виготовлених Monobind, можна надіслати запит електронною поштою з [Monobind@monobind.com](mailto:Monobind@monobind.com).

### 12.2 Інтерпретація результатів

1. **Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитися досвідченими професіоналами.**
2. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення тактики лікування, особливо, якщо отримані результати не співставляються з іншими дослідженнями.
3. Для дійсних результатів тесту відповідні контрольні та інші параметри повинні бути в межах перерахованих діапазонів і вимог до аналізу.
4. Monobind не несе відповідальності за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.

5. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
6. Реагенти з тестового набору були сформульовані таким чином, щоб максимально усунути інтерференцію; однак, потенційна взаємодія між поодинокими видами сироватки та випробувальними реагентами може призвести до помилкових результатів. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемою для всіх видів імунологічних аналізів (Boscato LM, Stuart MC. "Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays" Clin.Chem. 1988: 3427-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні використовуватися в комбінації з клінічним оглядом, історією хвороби та всіма іншими клінічними висновками.

## 13.0 ДІАПАЗОНИ ОЧІКУВАНИХ ЗНАЧЕНЬ

Рівні Інтерлейкіну-6 були виміряні за допомогою Тест-системи IL-6 Accubind® у явно нормальних зразках сироватки та плазми. Отримані значення наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

### Референсні діапазони для Тест-системи Інтерлейкіну-6

Нормальні пацієнти	< 35 пг/мл (pg/ml)
--------------------	--------------------

Важливо мати на увазі, що встановлення діапазону значень, які можна очікувати за певним методом для популяції «нормальних» людей, залежить від безлічі факторів: специфіки методу, сукупності випробуваних пацієнтів та точності методу в руках аналітика. З цих причин кожна лабораторія повинна залежати від діапазону очікуваних значень, встановлених виробником, до тих пір, поки аналітики не зможуть визначити внутрішній діапазон, використовуючи метод із популяцією, корінною для району, в якому розташована лабораторія.

## 14.0 ЛІТЕРАТУРА

1. Scheller, J.; Chalaris, A.; Schmidt-Arras, D.; Rose-John, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011, 1813, 878-888.
2. Tanaka, T.; Narazaki, M.; Kishimoto, T. ІНТЕРЛЕЙКІНУ-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2014;6: a016295
3. Gillmore JD, Lovat LB, Persey MR, Pepys MB, Hawkins PN. Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein. *Lancet*. 2001 Jul 7;358(9275):24-9. doi: 10.1016/S0140-6736(00)05252-1. PMID: 11454373.
4. Herold T, Jurinovic V, Arnreich C, Lipworth BJ, Hellmuth JC, von Bergwelt-Baildon M, Klein M, Weinberger T, Elevated levels of interleukin-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.05.008>.



#### **ВИРОБНИК**

Монобайнд, Іnc.  
100 Норт-Пуент-Драйв  
Лейк-Форест, Каліфорнія 92630  
Тел: 949.951.2665  
Факс: 949.951.3539  
[www.monobind.com](http://www.monobind.com)



#### **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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

