НАБІР ІФА

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ IL-10 ЛЮДИНИ

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

Каталог. № : ***BMS215/2/ BMS215/2TEN*** *Методика від* ***11-11-2014***
Версія ***24***
Кількість : ***96, 10x96***
Виробник : ***eBioscience, (Австрія)***

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

Тільки для дослідницьких цілей
Не для використання в діагностичних або терапевтичних процедурах

1. Призначення використання

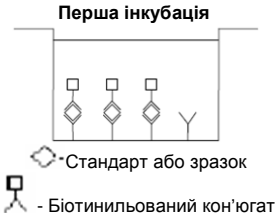
Даний набір Human IL-10 ELISA призначений для кількісного визначення інтерлейкіну-10 людини. **Набір призначений тільки для дослідницьких цілей і не повинен використовуватися в діагностиці або терапевтичних цілях.**

2. Резюме *(Див. оригінал інструкції англ. мовою).*

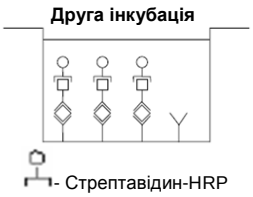
3. Принцип аналізу

Антитіла, специфічні до IL-10, нанесені в лунки планшета.

IL-10 людини в зразку або стандарті зв'язується з антитілами в лунках планшета. Біотинильовані антитіла IL-10 людини зв'язуються з IL-10 людини, захопленими першим антитілом.

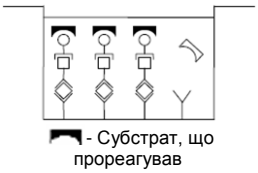


Після інкубації і промивання з лунок видаляється незв'язаний біотиновий кон'югат, і в лунки додається HRP-стрептавідин, що реагує з біотин-кон'югованим антитілом IL-10 людини.



Після інкубації незв'язаний стрептавідин-HRP видаляють під час стадії промивання і в лунки додається розчин субстрату, який вступив в реакцію з HRP.

Інтенсивність забарвлення, виміряна на довжині хвилі 450 нм, прямо пропорційна концентрації IL-10, присутнього в зразках або стандартах. Концентрація IL-10 в зразках визначається за стандартною кривою, побудованою по 7 приготованим розведенням стандарту.



4. Реагенти, що постачаються з набором

4.1 Реагенти в наборі Human IL-10 Platinum ELISA BMS215/2 (96 тестів)

1 планшет	**Мікропланшет**, покритий моноклональними антитілами до людського IL-10
1 флакон	**Кон'югат** моноклональних анти-IL-10 антитіл і **біотину**, 70 мкл
1 флакон	**Кон'югат стрептавідину з пероксидазою хрону**, 150 мкл
2 флакони	**Стандарт**, ліофілізований, 400 пг/мл після відновлення
1 флакон	**Контроль** високий, ліофілізований
1 флакон	**Контроль** низький, ліофілізований
1 флакон	**Концентрат Робочого буфера** 20x (PBS з 1% Tween 20 і 10% BSA), 5 мл
1 пляшка	**Промивний Буфер, концентрат** 20x (PBS з 1% Tween 20), 50 мл
1 флакон	**Субстратний розчин** (ТМБ), 15 мл
1 флакон	**Стоп-розчин** (1М фосфорна кислота), 15 мл
4	**Плівка для заклеювання смужок**

4.2 Реагенти в наборі Human IL-10 Platinum ELISA BMS215/2TEN (10 x 96 тестів)

10 планшетів	**Мікропланшет**, покритий моноклональними антитілами до людського IL-10
10 флаконів	**Кон'югат** моноклональних анти-IL-10 антитіл і **біотину**, 70 мкл
10 флаконів	**Кон'югат стрептавідину з пероксидазою хрону**, 150 мкл
10 флаконів	**Стандарт**, ліофілізований, 400 пг/мл після відновлення
10 флаконів	**Контроль** високий, ліофілізований
10 флаконів	**Контроль** низький, ліофілізований
3 флакони	**Концентрат Робочого буфера** 20x (PBS з 1% Tween 20 і 10% BSA), 5 мл
4 пляшки	**Промивний Буфер, концентрат** 20x (PBS з 1% Tween 20), 50 мл
10 флаконів	**Субстратний розчин** (ТМБ), 15 мл
1 флакон	**Стоп-розчин** (1М фосфорна кислота), 15 мл
20	**Плівка для заклеювання смужок**

5. Інструкції з зберігання - набір ІФА

Зберігайте компоненти набору при температурі 2-8 °C, крім контролів. Ліофілізовані контролі зберігайте при -20 ºC. Відразу після використання поверніть реагенти в холодильник. Зберігайте до дати, зазначеної на упаковці реагентів.
Тільки при відповідному зберіганні і виключенні контамінації під час попереднього використання набору гарантується якісна робота реагентів.

6. Забір і зберігання зразка

Супернатант культур клітин, людська сироватка і плазма (цитратна, гепаринова) можуть бути використані для аналізу даним методом. Інші біологічні зразки також можуть бути використані. Відділити сироватку або плазму від згустку або еритроцитів якомога швидше.
Зразки, що містять видимий преципітат, необхідно центрифугувати для відділення преципітату до аналізу. Не використовуйте сильно гемолізовані або ліпемічні зразки.
Якщо зразки не будуть протестовані в день збору, то їх необхідно аліквотувати, заморозити і зберігати при температурі -20 °C або нижче, щоб запобігти втраті біоактивності IL-10. Якщо аналіз буде виконаний в найближчі 24 години, зразки можуть зберігатися при 2-8 °C.
Запобігати повторним циклам заморожування-розморожування зразків. Перед аналізом заморожений зразок слід довести до кімнатної температури і обережно перемішати.

7. Необхідні, але не надані матеріали

- Калібровані піпетки на 5 мл і 10 мл
- Калібровані піпетки одноканальні змінного об'єму з одноразовими наконечниками на 5 - 1000 мкл
- Багатоканальні піпетки з одноразовими наконечниками на 50 - 300 мкл
- Ванна для реагентів для використання з багатоканальною піпеткою
- Калібровані склянки, колби, циліндри, необхідні для приготування реактивів
- Ручний або автоматичний промивний пристрій
- Мікропланшетний рідер з фільтром на 450 нм і, по можливості, фільтр порівняння ≥ 620 нм
- Дистильована або деіонізована вода
- Міліметровий папір або програмне забезпечення для обробки результатів (лінійна регресія)

8. Застереження щодо використання

- Всі хімікати вважати потенційно небезпечними. Рекомендується використання даних реагентів тільки кваліфікованим персоналом в лабораторних умовах. Використовувати захисний одяг, окуляри і рукавички. Уникати контакту з очима та шкірою. У разі контакту, промити з великою кількістю води.
- Набір призначений тільки для дослідницьких цілей і не повинен використовуватися в рутинних діагностичних процедурах.
- Не змішуйте різні лоти і реагенти з різних лотів.
- Не використовуйте реагенти з простроченим терміном зберігання.
- Уникайте опромінення реагентів сильним джерелом світла під час зберігання і інкубації.
- Не піпетувати ротом.
- Не можна їсти або курити в місці, де зберігаються реагенти і зразки або в місці, де проводиться аналіз.
- Уникайте контакту реагентів зі шкірою та слизовими.
- При ручному методі аналізу користуйтеся латексними рукавичками для захисту рук.
- Уникайте контакту субстратного розчину з металами і окислювачами.
- Уникайте розбризкування і накопичення аерозолів.
- Щоб уникнути мікробного забруднення або забруднення реактивами і отримання в результаті недостовірних результатів, користуйтеся одноразовими наконечниками.
- Використовуйте чистий, спеціально виділений посуд для кон'югатів і субстратного розчину.
- Забруднення кислотою інактивує кон'югат.
- Для приготування реактивів використовуйте дистильовану або деіонізовану воду.
- Субстратний розчин повинен мати кімнатну температуру перед використанням
- Знезаражуйте після роботи зразки, так як вони можуть бути інфіковані, переважно в автоклаві не менше 1 години при 121.5 °C.
- Рідкі відходи, що не містять кислоту, і нейтралізовані необхідно змішати з розчином гіпохлориту натрію таким чином, щоб вийшов в результаті 1% розчин гіпохлориту. Залиште отриману суміш на 30 хвилин для ефективного знезараження. Рідкі відходи, що містять кислоту, необхідно нейтралізувати до знезараження розчином гіпохлориту натрію.

9. Підготовка реагентів

Буферні концентрати привести до кімнатної температури і розвести перед початком аналізу.
Якщо в **буферних концентратах** утворилися кристали, акуратно підігріти їх до повного розчинення.

9.1 Розчин для промивання (1 х)

Розбавте 50 мл **концентрату** дистильованою або деіонізованою водою в мірному циліндрі до кінцевого обсягу 1,0 л. Перемішайте, уникаючи спінювання.
Зберігайте промивний розчин при 2-25 °C. Промивний розчин стабільний 30 днів.
Промивний розчин (1х) також може бути приготований згідно наступної таблиці:

Number of Strips	Wash Buffer Concentrate (20x) (ml)	Distilled Water (ml)
1 - 6	25	475
1 - 12	50	950

9.2 Робочий буфер (1 х)

Розбавте 5,0 мл **Концентрату (20х)** дистильованою водою в мірному циліндрі до кінцевого обсягу 100,0 мл. Перемішайте, уникаючи спінювання. Зберігайте при 2-8 °C. Робочий Буфер стабільний 30 днів.
Робочий буфер (1х) також може бути приготований згідно наступної таблиці:

Кількість смужок	Концентрат Робочого Буфера (20х), мл	Дистильована вода (мл)
1-6	2.5	47.5
1-12	5.0	95.0

9.3 Біотиновий Кон'югат

Зауважте, що Біотиновий Кон'югат повинен бути використаний протягом 30 хвилин після розведення.
Приготуйте 1:100 розведення концентрованого розчину Біотинового кон'югату з буфером для аналізу (1х) в чистій пластикової пробірці в міру необхідності у відповідності з наступною таблицею:

Кількість смужок	Біотиновий кон'югат, мл	Робочий буфер (1х) (мл)
1-6	0.03	2.97
1-12	0.06	5.94

9.4 Стрептавідин-HRP

Зауважте, що Стрептавідин-HRP повинен бути використаний протягом 30 хвилин після розведення.
Приготуйте 1:100 розведення концентрованого розчину стрептавідин-HRP з буфером для аналізу (1х) в чистій пластикової пробірці в міру необхідності у відповідності з наступною таблицею:

Кількість смужок	Стрептавідин-HRP, мл	Робочий буфер (1х) (мл)
1-6	0.06	5.94
1-12	0.12	11.88

9.5 Стандарт IL-10 людини

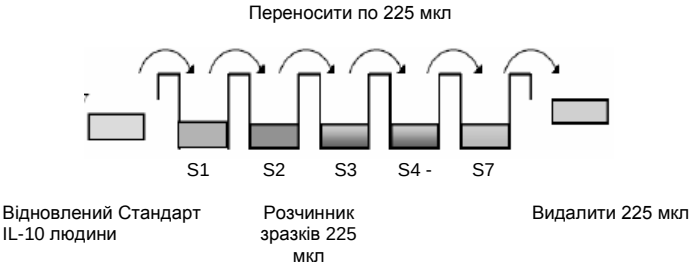
Розчиніть **Стандарт IL-10 людини** в дистильованій воді. Необхідний обсяг для розчинення вказано на етикетці флакона, що містить стандарт. Обережно перемішуйте до повного розчинення. Кінцева концентрація отриманого розчину складе 400 пг/мл. Залишити стандарт для відновлення на 10-30 хвилин. Ретельно перемішати перед розведенням.

Після використання стандарт, що залишився, не може зберігатися і повинен бути знищений.

Розведення стандарту можуть проводитися безпосередньо на планшеті (див. Пункт 10c) або альтернативно в пробірках (див. Пункт 9.5.1)

9.5.1 Зовнішнє розведення Стандарту

Помітити 7 пробірок, одну для кожної точки стандарту. S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7.
Потім підготувати серійні розведення 1:2 для стандартної кривої як зазначено нижче:
Піпетувати 225 мкл Робочого Буфера в кожну пробірку.
Піпетувати 225 мкл відновленого стандарту (концентрація стандарту = 400 пг/мл) в першу пробірку, позначену S1, і перемішати (концентрація стандарту 1 = 200 пг/мл).
Піпетувати 225 мкл цього розчину в другу пробірку, позначену S2, і ретельно перемішати перед наступним переміщенням.
Повторити серійні розведення ще 5 разів, таким чином формуючи точки стандартної кривої (Див. Малюнок нижче).
Розчинник зразків служить в якості бланка.



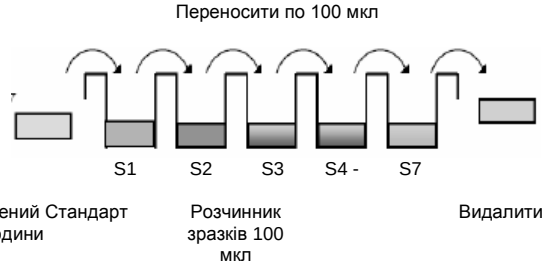
9.6 Контролі

Відновити шляхом додавання 300 мкл дистильованої води до ліофілізованих контролів (10-30 хвилин). Акуратно перемішати, щоб забезпечити повне і однорідне розчинення. Надалі поводитись з контролями як із зразками в аналізі. За даними щодо контрольного діапазону значень зверніться до сертифіката аналізу або етикетки флакона. Зберігати відновлені контролі аліквотованими при -20 °C. Уникайте циклів повторного заморожування і відтавання.

10. Протокол аналізу

a. Визначити кількість мікролункових стрипів, необхідних для перевірки необхідної кількості зразків плюс відповідну кількість лунок, необхідних для бланків і стандартів. Кожен зразок, стандарт, бланк і додаткові контрольні зразки повинні бути проаналізовані в двох примірниках. Видаліть зайві мікрострипи з тримача і зберігайте їх у пакеті з фольги з осушувачем при 2-8 °C щільно закритими.
b. Промийте лунки 2 рази з 400 мкл **Промивного Буфера** на лунку, повністю видаляючи рідину між промивками. Залишити на **10-15 секунд.** Уникайте подряпин на поверхні лунок. Перевертніть планшет на фільтрувальний папір після останньої промивки. Використовуйте стрипи негайно після струшування або максимум через 15 хвилин за умови, що стрипи покладені на вологий фільтрувальний папір в перевернутому вигляді. **Не дозволяйте лункам висихати!**

c. **Розведення стандарту на планшеті** (Альтернативно розведення стандарту може бути приготовлено в пробірках - див. 9.5.1): Додати 100 мкл Розчинника для зразків в дублях до всіх стандартів. Приготуйте стандартні розведення додаванням по 100 мкл розведеного Стандарту (розділ «Приготування реагентів» 9.5) в лунки A1 і A2 в дублях (Див. Табл. 1). Перемішайте вміст лунок A1 і A2 і перенесіть по 100 мкл розчину з лунок A1 і A2 в лунки B1 і B2 відповідно. Під час цих маніпуляцій постарайтеся не подряпати внутрішню поверхню лунок. Повторіть перенесення і розведення стандартів 5 разів, отримавши в підсумку 2 ряди розведень Стандарту IL-10 в діапазоні від 200.0 до 3.1 пг/мл. Видаліть 100 мкл рідини з останніх лунок (G1, G2).



При **зовнішньому розведенні стандарту** піпетувати 100 мкл цих розведень стандартів (S1-S7) в лунки для стандартів згідно з таблицею 1.
Таблиця 1: Схема розташування зразків, бланка і стандартів на планшеті.

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

Ст – Стандарт, З – Зразок

d. Внесіть по 100 мкл **Робочого Буфера (1x)** в дублікаті в **лунки «Бланк».**
e. Внесіть по 50 мкл **Робочого Буфера (1x)** в **лунки, призначені для зразків.**
f. Внесіть по 50 мкл кожного **зразка** в дублях в **лунки для зразків.**
g. Приготуйте **Біотиновий кон'югат** (розділ 9.3 «Приготування реагентів»).
h. Додайте по 50 мкл **Біотинового кон'югату** в усі лунки.
i. Закрийте планшет плівкою і інкубуйте 2 години при кімнатній температурі (18-25 °C), якщо можливо, використовуйте орбітальний струшувач, встановлений на 400 об/хв.
j. Підготуйте **Стрептавідин-HRP** (див. Розділ 9.4 Підготовка Стрептавідин-HRP).
k. Зніміть плівку. Повністю видаліть вміст лунок. **Промийте** лунки 3 рази як зазначено в кроці «b» цього Протоколу. Переходьте негайно до наступного кроку.
l. Внесіть по 100 мкл розведеного **Стрептавідин-HRP** в усі лунки, включаючи бланк.
m. Закрийте планшет плівкою і інкубуйте 1 годину при кімнатній температурі (18-25 °C), якщо можливо, використовуйте орбітальний струшувач, встановлений на 400 об/хв.
n. Зніміть плівку. Повністю видаліть вміст лунок. Промийте лунки 3 рази як зазначено в кроці «b» цього Протоколу. Переходьте негайно до наступного кроку.
o. Внесіть 100 мкл **Розчину Субстрату ТМБ** в усі лунки.
p. Інкубуйте при кімнатній температурі протягом приблизно 10 хвилин. Уникайте впливу прямих сонячних променів.

Розвиток кольору на пластині повинен контролюватися і реакція з субстратом повинна бути зупинена (див. наступний пункт цього протоколу), перш ніж позитивні лунки більше не фіксуються належним чином.

Визначення ідеального періоду часу для розвитку забарвлення має бути зроблено індивідуально для кожного аналізу.

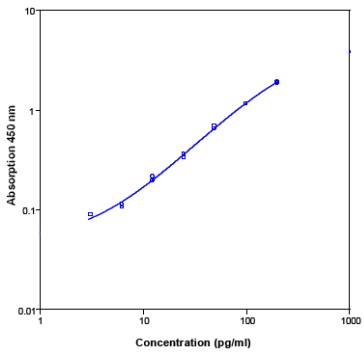
Рекомендується додавання стоп-розчину, коли найвищий стандарт досяг темно-синього кольору. Реакція повинна бути зупинена, як тільки Стандарт 1 досяг значення ОЩ 0.9 - 0.95.
q. Додайте по 100 мкл **Стоп-Розчину** в усі лунки, щоб повністю інактивувати фермент в лунках. Важливо вносити стоп-розчин швидко і з тією ж швидкістю, що і субстратний розчин. Оптичну щільність зчитати негайно після внесення стоп-розчину або протягом 1 години за умови, що стрипи перебували весь цей час при температурі 2-8 °C у темряві.
r. Визначте оптичну щільність всіх лунок при 450 нм, бажано використовувати довжину хвилі порівняння 620 нм (допустима довжина хвилі порівняння в діапазоні 610-650 нм). Обнулити мікропланшетний рідер згідно керівництва виробника, використовуючи лунку «Бланк». Визначте ОЩ як в лунках, що містять зразки, так і в лунках, що містять розведення стандарту IL-10.

Зауваження: якщо інкубація проводилася без струшування, значення можуть бути нижче, ніж в прикладі, наведеному нижче. Проте, ці результати також вважаються достовірними.

11. Розрахунок результатів

- Розрахуйте результати. Для цього розрахуйте середнє значення поглинання для кожного стандарту і зразка. Відхилення від середнього не повинно бути більше 20%.
- Використовуючи графічний папір, відзначте точки середніх значень поглинання стандартів на вертикальну вісь Y, а відповідні концентрації IL-10 на горизонтальну вісь X. Проведіть оптимальну криву по точкам.
- Визначте концентрації IL-10 в зразках зі стандартної кривої. Для цього знайдіть значення на осі ординат (Y), що відповідають середньому значенню отриманої для кожного зразка ОЩ і проведіть горизонтальну лінію до перетину зі стандартною кривою. Потім з точки перетину проведіть вертикальну лінію до перетину з віссю абсцис (X). Значення на осі X в точці перетину і буде відповідати концентрації IL-10 у відповідній пробі.
- **У ході аналізу, відповідно до даної інструкції, зразки були розведені 1:2, отже, концентрації, отримані з калібрувальної кривої, повинні бути помножені на коефіцієнт розведення (x2).**
- **Розрахунок зразків з оптичною щільністю вище значення Стандарту 1 може бути некоректний - результати будуть занижуватись. Такі зразки необхідно додатково розвести буфером для розведення і протестувати ще раз, для отримання результату, що відображає точну концентрацію IL-10.**
- Рекомендується, щоб в кожну серію аналізу включався контрольний зразок з відомою концентрацією IL-10. Якщо значення контролю не вкладаються в очікуваний діапазон, результати аналізу можуть бути недостовірні.
- Приклад стандартної кривої показаний на рисунку нижче. Не використовуйте цю стандартну криву для розрахунку ваших зразків. Стандартна крива повинна бути включена в кожну постановку.

Малюнок. Приклад стандартної кривої для IL-10. IL-10 був розбавлений в серії дворазових послідовних кроків титрування Розчинником для зразків. Тут представлені середні значення з трьох паралельних титрувань.
Не використовуйте цю стандартну криву для розрахунку ваших зразків. Стандартна крива повинна бути включена в кожну постановку.



Таблиця: Типові результати, отримані з використанням даного набору.

Вимірювання на 450 нм, довжина хвилі порівняння 620 нм.

Стандарт	IL-10, пг/мл	ОП (450 нм)	ОЩ, середнє	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

ОЩ, отримані для стандартів, можуть змінюватися в залежності від умов виконання аналізу (наприклад, температурний режим). Крім того, протягом терміну придатності набору ферментна активність, і, отже, інтенсивність фарбування, можуть змінюватися. При цьому результати тестування залишаються достовірними.

12. Обмеження

- Так як умови можуть змінюватися від аналізу до аналізу, стандартна крива повинна бути включена в кожну серію аналізу.
- Бактеріальне або грибкове забруднення зразків або реактивів може призвести до недостовірних результатів.
- Використовуйте одноразові наконечники.
- Скляний посуд повинен бути ретельно вимитий.
- Неповна промивка негативно впливає на точність результатів. Повністю видаляйте Промивний буфер з лунок між циклами промивання. Не дозволяйте лункам висихати між кроками аналізу.
- Використання радіоіммунотерапії значно збільшило число пацієнтів з антимишачими IgG людини (HAMA). HAMA можуть інтерферувати в аналізі, що використовує мишачі моноклональні антитіла, приводячи до хибно позитивних і хибно негативних результатів.
- Зразки сироватки, що містять антитіла до мишачих імуноглобулінів, можуть бути проаналізовані в разі, коли мишачі імуноглобуліни (сироватка, асцитна рідина або моноклональні антитіла іншої специфічності) додаються до розчинників зразків.

13. Робочі характеристики

13.1 Чутливість

Мінімально концентрація IL-10, яка визначається, це концентрація аналіту, що дає ОЩ значно вище, ніж буфер для розведення (середнє плюс 2 стандартних відхилення), і вона складає 1.0 пг/мл (середнє 6 незалежних визначень).

13.2 Відтворюваність

13.2.1 Відтворюваність всередині однієї серії

Відтворюваність всередині однієї серії визначалася в 3 незалежних серіях аналізу. У кожній серії аналізу було виконано по 6 визначень кожного з 5 зразків сироваток, що містять різні концентрації IL-10. У кожен планшет були включені по дві стандартні криві. У таблиці наведені середні значення IL-10 і коефіцієнт варіації для кожного зразка. Коефіцієнт варіації склав в середньому 3.2%.

Таблиця 3: Середнє значення концентрації і коефіцієнт варіації для кожного зразка

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 Відтворюваність між серіями

Відтворюваність між серіями в одній лабораторії визначалася в 3-х незалежних серіях аналізу трьома різними лаборантами. У кожній серії аналізу було виконано по 6 визначень кожного з 5 зразків сироватки, що містять різні концентрації IL-10. У кожен планшет були включені по дві стандартні криві. У таблиці наведені середні значення IL-10 і коефіцієнт варіації для кожного зразка, розрахований з 18 визначень кожного зразка. Коефіцієнт варіації склав в середньому 5.6%.

Таблиця 4: Середнє значення концентрації і коефіцієнт варіації кожного зразка

Зразок	Середнє значення концентрації, пг/мл	Коефіцієнт варіації, %
1	198	4.6
2	105	6.1
3	46	1.6
4	25	6.2
5	16	9.5

13.3 Ступінь вилучення

Ступінь вилучення оцінювали тестуючи зразки людської сироватки, збагачені 4 різними рівнями IL-10 людини. Витяг визначали в трьох незалежних експериментах в 4 зразках сироваток. Кількість ендогенного IL-10 в не насиченій сироватці використовували як бланк в даних експериментах. Діапазон становить 81-106% або в середньому 97%.

13.4. Лінійність

4 зразка людської сироватки, з різними рівнями IL-10, були проаналізовані в 2 серіях дворазових розведень, по 4 повтори кожне. Відновлення становить в середньому 107%, в діапазоні від 91% до 115%.

Таблиця 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	638	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 Стабільність зразків

13.5.1 Стабільність при заморожуванні-розморожуванні

Аліквоти сироватки (без доданого IL-10 і з додаванням IL-10) зберігалися при температурі -20 °C і розморожувалися 5 разів, після чого визначалися рівні IL-10. Не спостерігалося значних втрат імунореактивності IL-10.

13.5.2 Стабільність при зберіганні

Аліквоти сироватки (без доданого IL-10 і з додаванням IL-10) зберігалися при температурі -20 °C, 2-8 °C, кімнатній температурі і при 37 °C протягом 24 годин, після чого визначалися рівні IL-10. Не спостерігалося значних втрат імунореактивності IL-10 при зберіганні при -20 °C, 2-8 °C, кімнатній температурі. Значна втрата імунореактивності людського IL-10 (30%) була виявлена під час зберігання при 37 °C після 24 годин.

13.6 Порівняння сироватки та плазми

У 2 індивідуумів порівнювалися концентрації IL-10 в сироватці і плазмі, стабілізованій цитратом і гепарином. Істотних відмінностей в рівнях IL-10 в обумовлених зразках не спостерігалося, отже, всі ці зразки придатні для аналізу. Однак настійно рекомендується використовувати однорідні зразки для уніфікації досліджень.

13.7 Специфічність
Інтерференцію циркулюючих факторів імунної системи оцінювали введенням цих білків в фізіологічно значимих концентраціях в людську IL-10 позитивну сироватку.
Перехресну реактивність не спостерігали ні для одного з досліджених білків.

13.8 Очікувані значення
Панель з 40 сироваток, а також цитратної і гепаринової плазми з випадково вибраних здорових донорів (чоловіки і жінки) була випробувана на людський IL-10. Виміряні рівні можуть змінюватися в залежності від використовуваного відбору проб. Для виявлених рівнів людського IL-10 див. Таблицю 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 Калібрування
Даний аналіз відкалібрований по препарату високого очищення рекомбінантного IL-10, кількісна оцінка якого, в свою чергу, була виконана з Міжнародним референтним Стандартом NIBSC 93/722 і було показано, що вони еквівалентні.
Стандарт NIBSC 93/722 вимірюється в Міжнародних Одиницях (IU), 1IU відповідає 200 пг IL-10.

15. Підготовка реагентів (короткий виклад)
(Див. Оригінал інструкції).

16. Протокол аналізу (короткий виклад)
(Див. Оригінал інструкції).

ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул.Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

© Переклад українською мовою ТОВ «ДІАМЕБ»