



ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ НАБОР ВЫСОКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО IL-10

Кат. № : BMS215HS
Производитель : Bender MedSystems GmbH, (Австрия)

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

Методика от 01-08-2012
Версия 22

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 диагностики in vitro и не должен использоваться в терапевтических целях.

2. ВВЕДЕНИЕ (См. оригинал инструкции).

3. ПРИНЦИП ТЕСТА

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

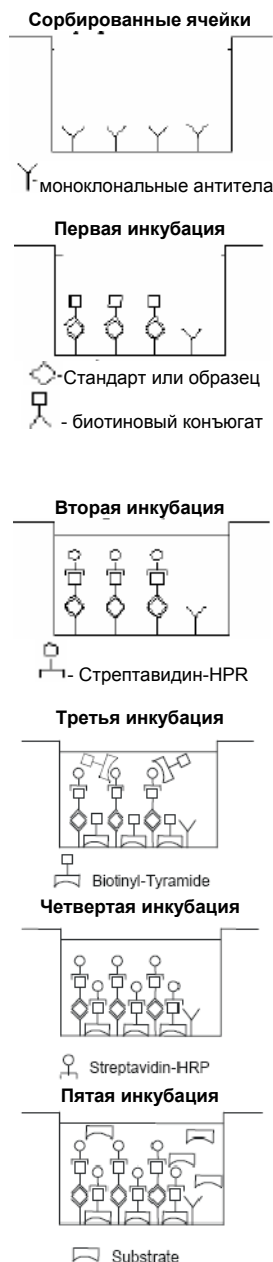
Человеческий IL-10, присутствующий в образце или стандарте, связывается с антителами, адсорбированными на лунках. Биотинилированные анти-человеческие IL-10 антитела добавляются и связываются с человеческим IL-10, захваченным первым антителом.

После инкубации несвязанные биотинилированные анти-человеческие IL-10 антитела удаляются во время стадии промывки. Стрептавидин-HRP добавляется и связывается с биотинилированным анти-человеческим IL-10 антителом.

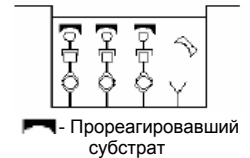
После инкубации несвязанный стрептавидин-HRP удаляется во время стадии промывки и реагент амплификации I (биотинил-tyramide) добавляется в лунки.

После инкубации несвязанный реагент усиления I удаляется во время этапа промывания и добавляется реагент усиления II (стрептавидин-HRP).

После инкубации несвязанный реагентов усиления II удаляется во время этапа промывки и реактивный раствор субстрата с HRP добавляется.



Окрашенный продукт образуется пропорционально количеству человеческого IL-10, присутствующего в образце или стандарте. Реакцию прекращают добавлением кислоты и измеряют поглощение при 450 нм. Стандартную кривую получали из 7 стандартных разведений человеческого IL-10 и определяли концентрацию человеческого IL-10 в образце.



4. ПРИНЦИП РЕАКЦИИ УСИЛЕНИЯ

Реакция усиления основана на технологии PerkinElmer Life Sciences TSA (Tyramide Усиление сигнала) (см. 15, ссылки 1 и 2). Реагент усиления I содержит биотинил-tyramide. HRP преобразует несколько биотинил-tyramide молекул в производные высокой реактивности (свободные радикалы). Эти свободные радикалы ковалентно соединяются с любым белок в лунке. Таким образом, количество прореагировавшего биотинил-tyramide пропорционально сумме HRP в лунке. После инкубации несвязанный биотинил-tyramide удаляется во время промывки. Реагент усиления II содержит стрептавидин-HRP, который связывается со сторонами биотина, созданного в течение биотинил-tyramide реакции, что делает возможным увеличение количества HRP молекул на поверхности для субстратной реакции.

5. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

- 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 2 флакона
- Контроль, лиофилизированный 1 флакон
- Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20 и 10 % BSA), 5 мл 1 флакон
- Разбавитель образцов, 12 мл 2 флакона
- Концентрат Разбавителя Амплификатора (2x), 7 мл 1 флакон
- Реагент усиления I, 75 мкл 2 флакона
- Реагент усиления II, 15 мкл 1 флакон
- Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 50 мл 2 бутылки
- Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл 1 флакон
- Стоп-раствор (1М фосфорная кислота), 15 мл 1 флакон
- Плётки для заклеивания стрипов 8

6. ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ – НАБОР ИФА

Храните компоненты набора при температуре 2-8°C, кроме контролей. Лиофилизированные контроли храните при -20°C. Сразу после использования верните реагенты в холодильник (2-8 °C), контроли в -20 °C. Храните до даты, указанной на упаковке реагентов. Только при соответствующем хранении и исключении контаминации во время предыдущего использования набора гарантируется качественная работа реагентов.

7. ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА

Супернатант культур клеток, человеческая сыворотка и плазма (ЭДТК, 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 заморозить и хранить при температуре -20 °C или ниже, чтобы предотвратить потерю биоактивности IL-10. Если анализ будет выполнен в ближайшие 24 часа, образцы могут храниться при 2-8 °C. Избегайте повторных циклов замораживания-размораживания образцов.

8. 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)

9. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

1. 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.
2. Набор предназначен только для исследовательских целей и не должен использоваться в рутинных диагностических процедурах.
3. Не смешивайте разные лоты и реагенты из разных лотов.
4. Не используйте реагенты с истекшим сроком хранения.
5. Избегайте облучения реагентов сильным источником света во время хранения и инкубации.
6. Не пипетируйте ртом.
7. Нельзя есть или курить в месте, где хранятся реагенты и образцы или в месте, где проводится анализ.
8. Избегайте контакта реагентов с кожей и слизистыми.
9. При ручном методе анализа пользуйтесь латексными перчатками для защиты рук.
10. Избегайте контакта субстратного раствора с металлами и окислителями.
11. Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей.
12. Чтобы избежать микробного загрязнения или загрязнения реактивами и получения в результате недостоверных результатов, пользуйтесь одноразовыми наконечниками.
13. Используйте чистую, специально выделенную посуду для конъюгатов и субстратного раствора.
14. Загрязнение кислотой инактивирует конъюгат.
15. Для приготовления реактивов используйте дистиллированную или деионизированную воду.
16. Субстратный раствор должен иметь комнатную температуру перед использованием
17. Обеззараживайте после работы образцы, так как они могут быть инфицированы, предпочтительно автоклавированием не менее 1 часа при 121.5 °С.
18. 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.

10. 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.

10.1 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

10.2 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 Рабочий буфер при 2-8 °С. Рабочий буфер стабилен 30 дней.

Рабочий буфер (1 x) 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

10.3 Биотиновый конъюгат

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

Приготовьте необходимое количество биотинового конъюгата, разведя концентрат биотинового конъюгата 1:600 Разбавителем образцов в чистой пластиковой посуде, согласно таблице:

Количество используемых стрипов	Биотиновый конъюгат, мл	Разбавитель образцов, (мл)
1-6	0.005	2.995
1-12	0.01	5.99

10.4 Стрептавидин-HRP

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

Приготовьте необходимое количество Стрептавидин-HRP разведя его 1:200 Рабочим буфером в чистой пластиковой посуде, согласно таблице:

Количество используемых стрипов	Стрептавидин-HRP, мл	Рабочий буфер(1x) (мл)
1-6	0.03	5.97
1-12	0.06	11.94

10.5 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 на 10-30 минут.

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

Концентрированный Стандарт человеческого IL-10 должен быть разбавлен 1:8 с Разбавителем образца непосредственно перед использованием в чистой пластиковой пробирке в соответствии со следующей схемой разбавления:

100 мкл концентрированного Стандарта человеческого IL-10 + 700 мкл Раствора для разведения образцов. Встряхнуть осторожно для перемешивания (концентрация стандарта = 50 пг/мл).

Разведения стандарта могут производиться непосредственно на планшете (см. пункт 11с) или альтернативно в пробирках (см. Пункт 10.5.1)

10.5.1 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 Разбавителя Образцов в каждую пробирку.

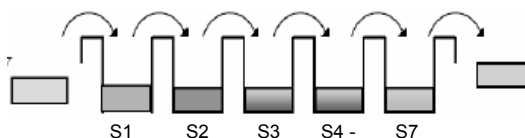
Пипетировать 225 мкл восстановленного стандарта (концентрация стандарта = 50 пг/мл) в первую пробирку, помеченную S1, и перемешать (концентрация стандарта 1 = 25 пг/мл).

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.

Переносить по 225 мкл



1:8 Разбавленный Стандарт Человеческого IL-10

Разбавитель образцов 225 мкл

Удалить 225 мкл

10.6 Контроли

Развести путем добавления 400 мкл дистиллированной воды к лиофилизированному контролю (10-30 минут). Покрутить или аккуратно перемешать, чтобы обеспечить полное растворение и однородность. Предварительно развести солибулизированный контроль 1:9 разбавителем образца:

100 мкл контроля + 800 мкл раствора для разведения образцов. В дальнейшем обращаться с контролями, как с образцами в анализе. За данными по контрольному диапазону см. сертификат анализа или этикетке флакона. Хранить восстановленный контроль в аликвотах при -20 °С. Избегать повторного замораживания и оттаивания.

10.7 Разбавитель Реагента Усиления (1x)

Подготовка Разбавителя Реагента Усиления (1x) должна быть проведена непосредственно перед использованием. Подготовить 1:2 разбавление концентрированного Разбавителя Реагента Усиления (2x) в соответствии со следующей таблицей:

Количество используемых стрипов	Разбавитель Реагента Усиления (2x), мл	Дистиллированная вода, (мл)
1-6	3	3
1-12	6	6

10.8 Раствор Реагента Усиления I

Подготовка Раствора Реагента Усиления I должна быть проведена непосредственно перед нанесением на планшет.

Центрифугировать флакон в течение нескольких секунд в микроцентрифуге перед открытием для сбора жидкости, захваченной в крышке.

Приготовить разведение 1:100 Реагента Усиления I в Разбавителе Реагента Усиления (1x) в соответствии со следующей таблицей:

Количество используемых стрипов	Реагент Усиления I, мл	Разбавитель Реагента Усиления (1x), (мл)
1-6	0.06	5.94
1-12	0.12	11.88

После использования немедленно избавиться от остатков Раствора Реагента Усиления I.

10.9 Раствор Реагента Усиления II

Подготовка Раствора Реагента Усиления II должна быть проведена непосредственно перед нанесением на планшет.

Центрифугировать флакон в течение нескольких секунд в микроцентрифуге перед открытием для сбора жидкости, захваченной в крышке.

Приготовить разведение 1:500 Реагента Усиления II в Рабочем буфере (1x) в соответствии со следующей таблицей:

Количество используемых стрипов	Реагент Усиления II, мл	Рабочий буфер (1x), (мл)
1-6	0.006	5.994
1-12	0.012	11.988

После использования немедленно избавиться от остатков Раствора Реагента Усиления II.

11. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

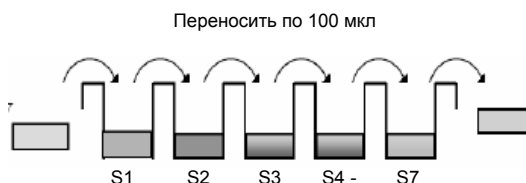
Так как ИФА является высокочувствительной системой, очень важно придерживаться руководства (процедуры промывки; хронология/и приготовления растворов; инкубационного периода), чтобы получить оптимальную производительность теста! Замачивания рекомендуется проводить между промывками, чтобы получить хорошую производительность теста!

Обратите внимание: Растворы Реагентов Усиления должны быть подготовлены непосредственно перед нанесением на планшет! Крайне важно, чтобы промывание лунок проводилось должным образом для получения хорошей производительности теста!

- Достаньте требуемое для проведения анализа число 8-луночных стрипов. Поместите требуемое количество стрипов в держатель (к необходимому числу ячеек для Образцов добавьте ячейки для Бланка, Стандартов и Контроля). Все Стандарты, Бланк и Образцы необходимо анализировать в дублях. Неиспользованные стрипы сразу уберите в пакет с осушителем и храните плотно закрытым при 2-8°C.
- Промойте ячейки 2 раза 400 мкл Промывочного Буфера, 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): Добавить 100 мкл Разбавителя для образцов в дублях ко всем стандартам. Приготовьте стандартные разведения добавлением по 100 мкл разбавленного Стандарта (раздел 10.5) 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 25.00 до 0.39 пг/мл. Удалите и выбросьте 100 мкл жидкости из последних ячеек (G1, G2).



1:8 Разведенный 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 (25.00 пг/мл)	Ст #1 (25.00 пг/мл)	O 1	O 1
B	Ст #2 (12.50 пг/мл)	Ст #2 (12.50 пг/мл)	O 2	O 2
C	Ст #3 (6.25 пг/мл)	Ст #3 (6.25 пг/мл)	O 3	O 3
D	Ст #4 (3.13 пг/мл)	Ст #4 (3.13 пг/мл)	O 4	O 4
E	Ст #5 (1.56 пг/мл)	Ст #5 (1.56 пг/мл)	O 5	O 5
F	Ст #6 (0.78 пг/мл)	Ст #6 (0.78 пг/мл)	O 6	O 6
G	Ст #7 (0.39 пг/мл)	Ст #7 (0.39 пг/мл)	O 7	O 7
H	Бланк	Бланк	O 8	O 8

Ст – Стандарт, O – образец

- Внесите по 100 мкл Разбавителя образцов в дубликаты в ячейки «Бланк».
- Внесите по 50 мкл Разбавителя образцов в ячейки, предназначенные для образцов.
- Внесите по 50 мкл каждого образца в дублях в соответствующие ячейки.
- Приготовьте биотиновый конъюгат (раздел 10.3).
- Добавьте по 50 мкл биотинового конъюгата во все ячейки.
- Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18–25°C), если возможно, используя орбитальный шейкер, установленный на 400 об/мин.
- Приготовьте Стрептавидин-HRP (раздел 10.4).
- Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек. Промойте ячейки 6 раз 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°C), используя орбитальный шейкер, установленный на 400 об/мин. (Шейкирование является обязательным для получения оптимальной работы теста).
- Подготовьте Раствор Реагента Усиления I, разбавленный в Разбавителе Реагента Усиления (1x) (см. 10.8) непосредственно перед использованием.

- o. Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек. Промойте ячейки 6 раз как указано в шаге «b.» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- p. Внесите по 100 мкл **Раствора Реагента Усиления I** во все ячейки, включая бланк.
- q. Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте **точно** 15 минут при комнатной температуре (18–25°C), используя орбитальный шейкер, установленный на 400 об/мин. (**Шейкирование является обязательным для получения оптимальной работы теста**).
- г. Подготовьте **Раствор Реагента Усиления II**, разбавленный в **Рабочем буфере** (см. 10.9) **непосредственно перед использованием**.
- s. Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек. Промойте ячейки 6 раз как указано в шаге «b.» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- t. Внесите по 100 мкл **Раствора Реагента Усиления II** во все ячейки, включая бланк.
- u. Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте **точно** 30 минут при комнатной температуре (18–25°C), используя орбитальный шейкер, установленный на 400 об/мин.
- v. Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек. Промойте ячейки 6 раз как указано в шаге «b.» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- w. Внесите 100 мкл **раствора субстрата ТМБ** во все лунки.
- x. Инкубируйте стрипы при комнатной температуре (18 °C до 25 °C) в течение примерно 10-20 мин. Избегайте прямого воздействия интенсивного света.

Развитие цвета на планшете должно проверяться и реакция субстрата остановлена (см. следующий пункт этого протокола) до того, как положительные лунки больше четко не прослеживаются.

Определение идеального периода времени для проявления цвета должно быть сделано индивидуально для каждого анализа.

Рекомендуется добавить стоп-раствор, когда самый высокий стандарт приобрел синий цвет. Альтернативно развитие цвета можно контролировать с помощью считывателя ELISA при 620 нм. Субстратная реакция должна быть остановлена, как только стандарт 1 достиг OD 0,9 - 0,95.

- y. Остановить ферментативную реакцию быстрым пипетированием 100 мкл **стоп-раствора** в каждую лунку. Важно, чтобы стоп-раствор добавлялся быстро и равномерно по всем лункам для полной инактивации фермента. Результаты должны быть считаны непосредственно после добавления стоп-раствора или в течение одного часа, если стрипы хранят при 2 - 8 °C в темноте.
- z. Измерить оптическую плотность каждой микролунки на спектрофотометре с использованием длины волны 450 нм в качестве основной (опционально использовать длину волны 620 нм в качестве контрольной; 610-650 нм также приемлемы). Обнулить планшет-ридер в соответствии с инструкциями производителя с помощью пустых лунок. Определить поглощения обоих образцов и стандартов.

Примечание: В случае инкубации без встряхивания значения полученного OD могут быть ниже указанных. Тем не менее, результаты остаются в силе.

12. 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).**

- **Расчет образцов с концентрацией, превышающей стандарт 1, может привести к ложным, низким уровням человеческого IL-10 . Такие образцы требуют дальнейшего внешнего предварительного разведения в соответствии с ожидаемыми значениями человеческого IL-10 для разбавления проб для точного количественного определения реального человеческого 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.

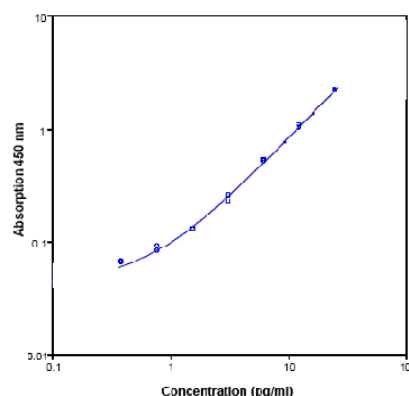


Таблица: Типичные результаты, полученные с использованием данного набора.

Измерение на 450 нм, длина волны сравнения 620 нм.

Стандарт	IL-10, пг/мл	ОП (450 нм)	ОП, среднее	CV, %
1	25.00	2.193 2.201	2.197	0.3
2	12.50	1.020 1.070	1.045	3.4
3	6.25	0.531 0.514	0.523	2.3
4	3.13	0.253 0.225	0.239	8.3
5	1.56	0.129 0.127	0.128	1.1
6	0.78	0.091 0.081	0.086	8.2
7	0.39	0.065 0.066	0.066	1.1
Бланк	0.00	0.037 0.036	0.037	1.4

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.

13. 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 удаляйте Промывочный буфер из ячеек между циклами промывки. Не позволяйте ячейкам высыхать между шагами анализа.
- Использование радиоиммунотерапии значительно увеличило число пациентов с человеческими антимышиными IgG (HAMA).

НАМА могут интерферировать в анализе, использующем 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.

14. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

14.1 Чувствительность

Минимально определяемая концентрация IL-10, определенная как концентрация аналита, дающая ОП значительно выше чем буфер для разведения (среднее плюс 2 стандартных отклонения), составила 0.05 пг/мл (среднее 6 независимых определений).

14.2 Воспроизводимость

14.2.1 Воспроизводимость внутри одной серии

Воспроизводимость внутри одной серии определялась в 3 независимых сериях анализа. В каждый серии анализа было выполнено по 6 определений каждого из 8 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 6.8 %.

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

Образец	Эксперимент	Концентрация IL-10, пг/мл	Коефф. Вариации (%)
1	1	7.64	10
	2	7.99	8
	3	7.97	8
2	1	1.27	8
	2	1.16	8
	3	1.47	8
3	1	1.16	7
	2	1.12	9
	3	1.09	5
4	1	5.11	1
	2	5.23	3
	3	6.39	4
5	1	1.55	7
	2	1.38	8
	3	1.64	8
6	1	3.65	4
	2	3.27	8
	3	4.41	6
7	1	2.45	8
	2	2.68	7
	3	3.04	7
8	1	3.09	9
	2	3.13	7
	3	3.60	6

14.2.2 Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями в одной лаборатории определялась в 2-х независимых сериях анализа. В каждый серии анализа было выполнено по 6 определений каждого из 8 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 7.5 %.

Таблица 4: Среднее значение концентрации и коэффициент вариации каждого образца

Образец	Среднее значение концентрации, пг/мл	Коеэффициент вариации, %
1	7.87	9.0
2	1.30	8.0
3	1.12	7.1
4	5.58	2.5
5	1.53	7.7
6	3.78	6.1
7	2.73	7.1
8	3.27	7.1

14.3 Извлечение

Извлечение оценивали тестируя образцы человеческой сыворотки, обогащенные 4 различными уровнями IL-10 человека. Извлечение определяли в 2 независимых экспериментах в 8 образцах сывороток. Количество эндогенного человеческого IL-10 в

обогащенной сыворотке вычитали из значений необогащенных образцов. Извлечение составило в среднем 94 %; диапазон 78-111 %.

14.4. Линейность

4 образца сыворотки с различными уровнями человеческого IL-10 были проанализированы в последовательных 2 кратных разведениях с 4 повторами каждое.

Восстановление колебалось от 98% до 118% при общем восстановлении 111% (см. таблицу 5).

Таблица 5

Образец	Разведение	Концентрация IL-10, пг/мл		
		Ожидаемое значение	Наблюдаемое значение	% извлечения
1	1	--	40.4	--
	2	20.2	22.3	111
	4	11.2	13.2	118
	8	6.6	7.4	112
2	1	--	38.2	--
	2	19.1	18.8	98
	4	9.4	11.1	118
	8	5.5	6.4	115
3	1	--	17.7	--
	2	8.9	9.3	105
	4	4.7	5.5	117
	8	2.7	3.0	109
4	1	--	40.4	--
	2	20.2	22.3	111
	4	11.2	13.2	118
	8	6.6	7.4	112

14.5 Стабильность образцов

14.5.1 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.

14.5.2 Стабильность при хранении

Аликвоты сыворотки (без добавленного IL-10 и с добавлением IL-10) хранились при температуре -20°C , $2-8^{\circ}\text{C}$, 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 , $2-8^{\circ}\text{C}$ и КТ. Значительные потери иммунореактивности человеческого IL-10 (30%) были обнаружены во время хранения при 37°C в течение 24 часов.

14.6 Сравнение сыворотки и плазмы

От 2 людей были взяты оба образца, как сыворотки, так и ЭДТА, цитратной и гепариновой плазмы, и тестированы в одно и то же время на человеческий IL-10. Концентрации существенно не отличались, и поэтому все эти препараты крови являются подходящими для использования в анализе. Тем не менее, настоятельно рекомендуется обеспечить единообразие препаратов крови.

14.7 Специфичность

Интерференция циркулирующих факторов иммунной системы оценивалась путем насыщения этих белков в физиологически значимых концентрациях в человеческую IL-10 положительную сыворотку.

Перекрестной реактивности не наблюдалось.

14.8 Ожидаемые значения

Панель из 16 образцов сыворотки случайно выбранных практически здоровых людей (мужчин и женщин) была протестирована на содержание IL-10.

Обнаруженные уровни человеческого IL-10 оказались в диапазоне от 0.16 до 12.70 пг/мл при среднем уровне 4.70 пг/мл и стандартным отклонением 3.40 пг/мл.

Нормальные измеренные уровни могут меняться в зависимости от используемых образцов.

14.9 Калибровка

Данный метод прокалиброван по высокочистому 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 человеческого IL-10.

15. ЛИТЕРАТУРА (См. в оригинале инструкции).

17. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ) (См. оригинал инструкции).

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

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «ДИАМЕБ»
Ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua