

Інструкція по застосуванню

ІФА інтерлейкін-10

Імуноферментний аналіз для кількісного визначення
інтерлейкіну-10 людини (IL-10)
у супернатантах клітинної культури, сироватці та плазмі (цитрат,
гепарин).

REF 30147233

 **96**

  **2°C**  **8°C**

Тільки для досліджень.

Не для використання в діагностичних процедурах.



IBL International GmbH
Флюгафенштрассе, 52а
D-22335 Гамбург, Німеччина

Always there for you

1 Передбачуване використання

ІФА на інтерлейкін-10 — це імуноферментний аналіз для кількісного виявлення ІЛ-10 людини. Тільки для досліджень. Не використовувати в діагностичних процедурах.

2 ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

Інтерлейкін-10 є плейотропним цитокіном, який відіграє важливу роль як регулятор функції лімфоїдних і мієлоїдних клітин. Завдяки здатності IL-10 для блокування синтезу цитокінів і кількох додаткових клітинних функцій макрофагів, цей цитокін є потужним супресором ефекторних функцій макрофагів, Т-клітин і NK-клітин. Крім того, IL-10 бере участь у регуляції проліферації та диференціації В-клітин, тучних клітин і тимоцитів.

Первинна структура IL-10 людини була визначена шляхом клонування кДНК, що кодує цитокін. Відповідний білок містить 160 амінокислот із передбачуваною молекулярною масою 18,5 кДа. На основі його первинної структури IL-10 є членом сімейства цитокінів із чотирьох пучків α -спіралі. У розчині людський IL-10 є гомодимером з уявною молекулярною масою 39 кДа. Хоча він містить N-зв'язаний сайт глікозилування, йому не вистачає вуглеводів, які можна виявити. Таким чином, рекомбінантний білок, експресований в *E.coli*, зберігає всю відому біологічну активність. Ген IL-10 людини розташований на хромосомі 1 і присутній у вигляді єдиної копії в геномі.

Людський IL-10 демонструє сильну гомологію ДНК і амінокислотної послідовності з мишачим IL-10 і відкриту рамку зчитування в геномі вірусу Епштейна-Барр, BCRF1, яка поділяє багато біологічної активності клітинних цитокінів і тому може відігравати певну роль у взаємодії хост-вірус.

3 Принципи аналізу

Антитіло покриття ІЛ-10 людини адсорбується на мікролунках.

ІЛ-10 людини, присутній у зразку або стандарті, зв'язується з антитілами, адсорбованими на мікролунках. Біотин - кон'юговане антитіло до ІЛ-10 додається і зв'язується з ІЛ-10 людини, захопленим першим антитілом.

Після інкубації незв'язані біотин-кон'юговані антитіла до ІЛ-10 видаляють під час етапу промивання. Стрептавідин-HRP додається і зв'язується з біотин-кон'югованим антитілом до ІЛ-10.

Після інкубації незв'язаний стрептавідин-HRP видаляють під час етапу промивання, а в лунки додають розчин субстрату, який реагує з HRP.

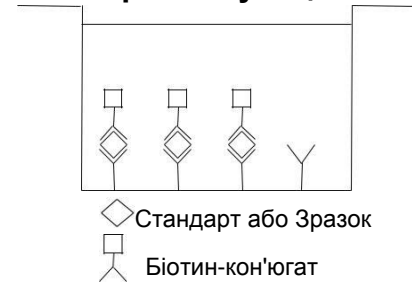
Забарвлений продукт утворюється пропорційно кількості ІЛ-10 людини, присутнього в зразку або стандарті. Реакцію припиняють додаванням кислоти і вимірюють поглинання при 450 нм. Стандартну криву готують із 7 стандартних розведень ІЛ-10 людини та визначають концентрацію зразка ІЛ-10 людини.

Фігура 1



Малюнок 2

Перша інкубація



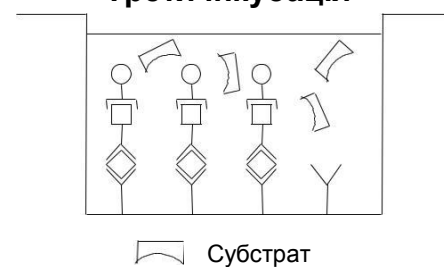
Малюнок 3

Друга інкубація

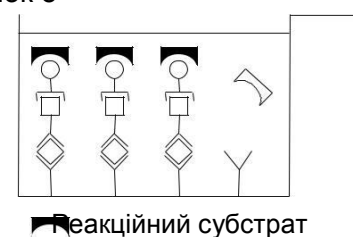


Малюнок 4

Третя інкубація



Малюнок 5



4 Надані реагенти

MTP	1 алюмінієвий пакет з планшетом для мікротитрування (12 стріпів по 8 лунок у кожній) покриті моноклональними антитілами до IL-10 людини
БІОТИН КОНЦ	1 флакон (70 мкл) біотин -кон'югат моноклонального антитіла IL-10 людини
ENZCONJ КОНЦ	1 флакон (150 мкл) Стрептавідин-HRP
КАЛ LYO	2 флакони людського IL-10 Стандарт ліофілізовані, 400 пг/мл після відновлення
КОНТРОЛЬ Х LY O	1 флакон Контрольний високий, ліофілізований
КОНТРОЛЬ Л LY O	1 флакон Контроль низький, ліофілізований
ASSAYBUF КОНЦ	1 флакон (5 мл) Буферний концентрат для аналізу 20x (PBS з 1% Tween 20, 10% BSA)
WASHBUF КОНЦ	1 пляшка (50 мл) концентрат промивного буфера 20x (PBS з 1% Tween 20)
SUBS	1 флакон (15 мл) розчину субстрату (тетраметилбензидин)
STOP	1 флакон (15 мл) Стоп-розчин (1М фосфорна кислота)
	4 Клейкі плівки

5 Інструкції щодо зберігання – набір для ІФА

Зберігайте реагенти набору при температурі від 2° до 8°C, крім контрольних. Зберігати ліофілізовані контролю при -20°C. Відразу після використання решту реагентів повернути в холодне зберігання (2° - 8°C), контролю до -20°C відповідно. Термін придатності набору та реагентів вказано на етикетках. Закінчення терміну придатності компонентів набору може бути гарантовано лише за умови належного зберігання компонентів, а також якщо у разі повторного використання одного компонента цей реагент не забруднений під час першої обробки.

6 Інструкції зі збирання та зберігання зразків

За допомогою цього аналізу досліджували супернатант клітинної культури, сироватку та плазму (цитрат, гепарин). Інші біологічні зразки можуть бути придатними для використання в аналізі. Видаліть сироватку або плазму із згустку або клітин якомога швидше після згортання та відділення. Зразки, що містять видимий осад, повинні бути очищені перед використанням у аналізі. Не використовуйте сильно гемолізовані або ліпемічні зразки. Зразки слід розділити на аліквоти та зберігати в замороженому вигляді при -20°C, щоб уникнути втрати біологічно активного IL-10 людини. Якщо зразки потрібно аналізувати протягом 24 годин, їх можна зберігати при температурі від 2° до 8°C (стабільність зразка див. у 13.5). Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання. Перед аналізом заморожений зразок слід повільно довести до кімнатної температури та обережно перемішати.

7 Матеріали необхідні, але не надані

- Градуйовані піпетки на 5 і 10 мл
- Регульовані одноканальні мікропіпетки від 5 мкл до 1000 мкл з одноразовими наконечниками
- Регульована багатоканальна мікропіпетка від 50 мкл до 300 мкл з одноразовими наконечниками
- Багатоканальний резервуар мікропіпетки
- Стакани, колби, циліндри, необхідні для приготування реагентів
- Пристрій для подачі промивного розчину (багатоканальна промивна пляшка або система автоматичного миття)
- Мікролунковий пристрій для зчитування стріпів, здатний зчитувати при 450 нм (620 нм як додаткова референтна довжина хвилі)
- Скляна дистильована або дейонізована вода
- Статистичний калькулятор з програмою для виконання регресійного аналізу

8 Запобіжні заходи при застосуванні

- Усі хімічні речовини слід розглядати як потенційно небезпечні. Тому ми рекомендуємо, щоб з цим продуктом працювали лише ті особи, які пройшли навчання з лабораторних методів та використовували його відповідно до принципів належної лабораторної практики. Носіть відповідний захисний одяг, такий як лабораторний комбінезон, захисні окуляри та рукавички. Слід дотримуватися обережності, щоб уникнути контакту зі шкірою або очима. У разі потрапляння на шкіру або в очі негайно промити водою. Для отримання конкретних рекомендацій див. Паспорт безпеки.
- Реагенти призначені лише для досліджень і не призначені для використання в діагностичних або терапевтичних процедурах.
- Не змішуйте та не замінюйте реагенти реагентами з інших партій чи інших джерел.
- Не використовуйте реагенти набору після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці.
- Не піддавайте реагенти набору впливу сильного світла під час зберігання або інкубації.
- Не піпетуйте ротом.
- Не їжте і не паліть в місцях, де працюють з реагентами або зразками набору.
- Уникайте контакту шкіри або слизових оболонок з реагентами або зразками набору.
- Під час роботи з реагентами або зразками набору слід надягати гумові або одноразові латексні рукавички.
- Уникайте контакту розчину субстрату з окислювачами та металом.
- Уникайте розбризкування або утворення аерозолів.
- Щоб уникнути мікробного забруднення або перехресного забруднення реагентів або зразків, які можуть зробити тест недійсним, використовуйте одноразові наконечники для піпеток та/або піпетки.
- Використовуйте чисті спеціальні лотки для реагентів для дозування реагенту кон'югату та субстрату.
- Вплив кислоти інактивує кон'югат.
- Для приготування реагентів необхідно використовувати скляну дистильовану воду або дейонізовану воду.
- Розчин субстрату перед використанням повинен бути кімнатної температури.
- Дезактивуйте та утилізуйте зразки та всі потенційно заражені матеріали, оскільки вони можуть містити інфекційні агенти. Кращим методом дезактивації є автоклавування протягом мінімум 1 години при 121,5°C.
- Рідкі відходи, що не містять кислоти, та нейтралізовані відходи можна змішувати з гіпохлоритом натрію в таких обсягах, щоб кінцева суміш містила 1,0% гіпохлориту натрію. Дайте 30 хвилин для ефективної дезактивації. Перед додаванням гіпохлориту натрію рідкі відходи, що містять кислоту, необхідно нейтралізувати.

9 Приготування реагентів

1. Буферні концентрати слід довести до кімнатної температури і розбавити перед початком процедури тестування.
2. Якщо в буферних концентратах утворилися кристали, обережно нагрійте їх до повного розчинення.

9.1 Буфер для промивання (1х)

1. Налийте весь вміст (50 мл) концентрату промивного буфера (20х) у чистий градуйований циліндр об'ємом 1000 мл. Доведіть до кінцевого об'єму 1000 мл дистильованою або дейонізованою водою.
2. Акратно перемішайте, щоб уникнути піни.
3. Перекласти в чисту пляшку для миття і зберігати при температурі від 2° до 25°С. Зверніть увагу, що промивний буфер (1х) стабільний протягом 30 днів.
4. Буфер для промивання (1х) також можна приготувати за потребою відповідно до наступної таблиці:

Кількість стріпів	Буферний концентрат для аналізу (20х) (мл)	Дистильована вода (мл)
1 - 6	25	475
1 - 12	50	950

9.2 Буфер для аналізу (1х)

1. Перелийте весь вміст (5 мл) концентрату буферного розчину для аналізу (20х) у чистий градуйований циліндр на 100 мл. Доведіть до кінцевого об'єму 100 мл дистильованою водою. Акратно перемішайте, щоб уникнути піни.
2. Зберігати при температурі від 2° до 8°С. Зверніть увагу, що буфер для аналізу (1х) стабільний протягом 30 днів.
3. Буфер для аналізу (1х) також можна приготувати за потребою відповідно до наступної таблиці:

Кількість стріпів	Буферний концентрат для аналізу (20х) (мл)	Дистильована вода (мл)
1 - 6	2.5	47.5
1 - 12	5.0	95.0

9.3 Біотин - кон'югат

Примітка: біотин-кон'югат слід використати протягом 30 хвилин після розведення.

Розведіть 1:100 концентрований розчин біотин-кон'югату буфером для аналізу (1х) у чистій пластиковій пробірці відповідно до наведеної нижче таблиці:

Кількість стріпів	Кон'югат біотин (мл)	Буфер для аналізу (1х) (мл)
1 - 6	0,03	2,97
1 - 12	0,06	5.94

9.4 Стрептавідин-HRP

Зверніть увагу, що Стрептавідин-HRP слід використати протягом 30 хвилин після розведення.

Розведіть концентрований розчин стрептавідин-HRP 1:100 буфером для аналізу (1х) у чистій пластиковій пробірці відповідно до наведеної нижче таблиці:

Кількість стріпів	Стрептавідин-HRP (мл)	Буфер для аналізу (1х) (мл)
1 - 6	0,06	5.94
1 - 12	0,12	11.88

9.5 Стандарт ІЛ-10 людини

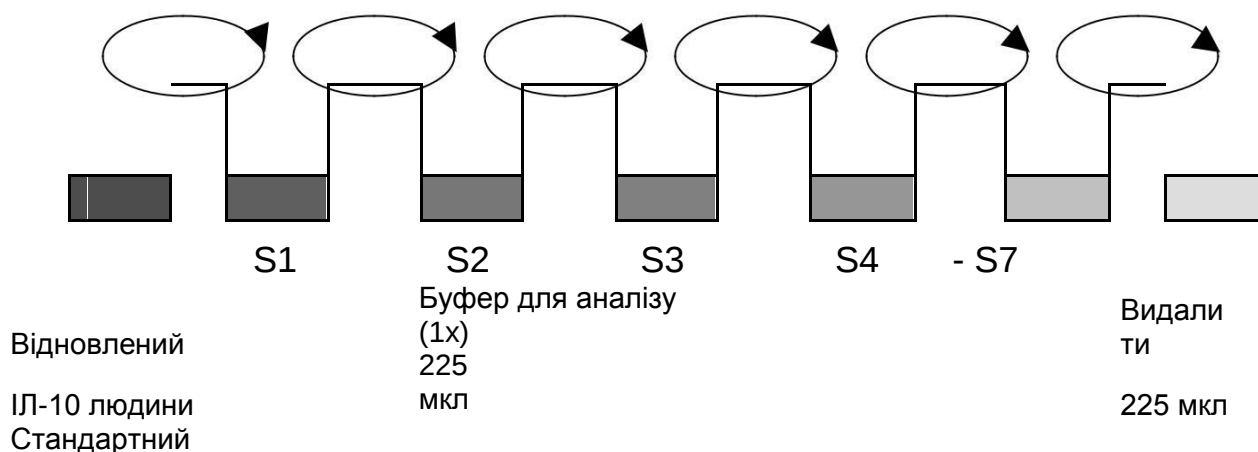
1. Відновіть стандарт ІЛ-10 людини, додавши дистильовану воду.
2. Об'єм розчинення вказано на етикетці стандартного флакона. Перемішайте або обережно перемішайте, щоб забезпечити повну та однорідну солюбілізацію (концентрація відновленого стандарту = 400 пг/мл).
3. Дайте стандарту відновитися протягом 10-30 хвилин. Добре перемішайте перед приготуванням розведень.
4. Після використання, що залишився стандарт, не можна зберігати і його потрібно викинути.
5. Стандартні розведення можна готувати безпосередньо на планшеті з мікролунками (див. 10. Пункт с) протоколу випробувань або в пробірках (див. 9.5.1 Зовнішнє стандартне розведення).

9.5.1 Зовнішнє стандартне розведення

1. Маркуйте 7 пробірок, по одній на кожну стандартну точку. S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 Приготуйте послідовні розведення 1:2 для стандартної кривої наступним чином:
2. Внесіть піпеткою 225 мкл буфера для аналізу (1x) у кожну пробірку.
3. Внесіть піпеткою 225 мкл відновленого стандарту (концентрація = 400 пг/мл) у першу пробірку з позначкою S1 і перемішайте (концентрація стандарту 1 = 200 пг/мл).
4. Внесіть піпеткою 225 мкл цього розведення в другу пробірку, позначену як S2, і ретельно перемішайте перед наступним перенесенням.
5. Повторіть серійні розведення ще 5 разів, створюючи точки стандартної кривої (див. малюнок 6).
6. Буфер для аналізу (1x) служить заготівлею.

Малюнок 6

Перенесіть 225 мкл



9.6 Контролі

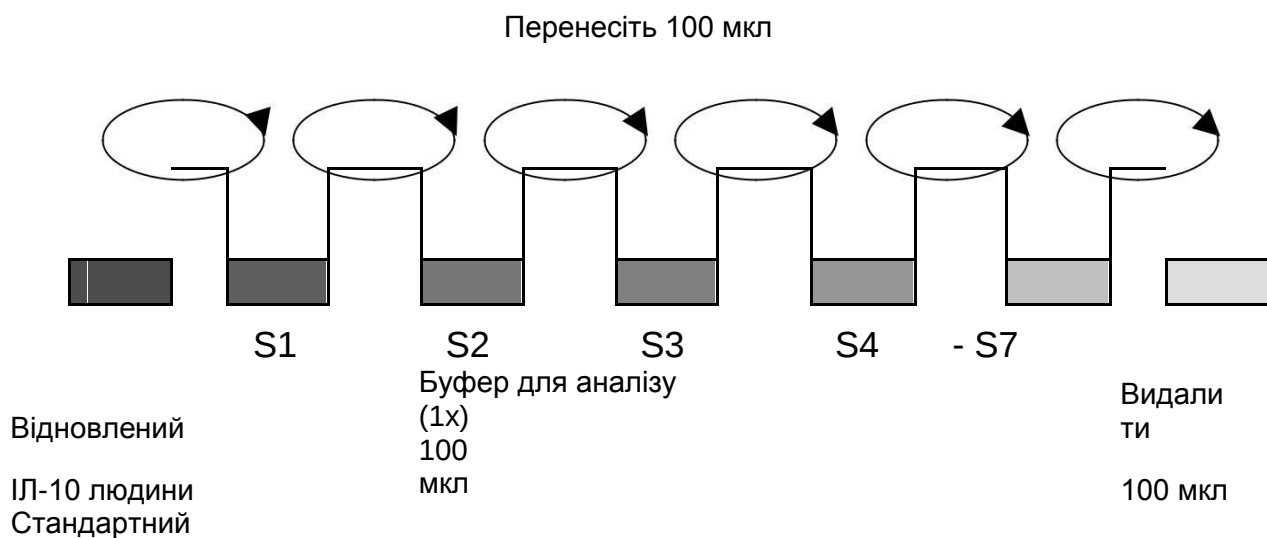
Відновіть ліофілізовані контролі, додавши дистильовану воду (10-30 хвилин). Об'єм розчинення вказано на етикетці контрольного флакона. Перемішайте або обережно перемішайте, щоб забезпечити повну та однорідну солюбілізацію. Надалі поведіться з контролями як зі своїми зразками в аналізі.

Діапазон контролю можна знайти в сертифікаті аналізу. Зберігати відновлені контролі в аликвотах при -20°C.

10 Протокол випробувань

- Визначте кількість стріпів для мікролунок, необхідних для тестування бажаної кількості зразків, а також відповідну кількість лунок, необхідних для запуску бланків і стандартів. Кожен зразок, стандарт, бланк і необов'язковий контрольний зразок слід аналізувати в двох примірниках. Вийміть додаткові стріпи з мікролунками з тримача та зберігайте їх у пакеті з фольги з щільно закритим осушувачем, що постачається при температурі 2°-8°C.
- Двічі промийте стріпи з мікролунками приблизно по 400 мкл промивного буфера на лунку з ретельною аспірацією вмісту мікролунок між промиваннями. Дайте промивному буферу постояти в лунках приблизно 10-15 секунд перед аспірацією. Слідкуйте за тим, щоб не подрпати поверхню мікролунок. Після останнього етапу промивання спорожніть лунки та постукайте стріпами мікролунок по абсорбуючому прокладці або паперовому рушнику, щоб видалити надлишок промивного буфера. Використовуйте стріпи з мікролунками відразу після промивання. В якості альтернативи стріпи з мікролунками можна покласти догори дном на вологий абсорбуючий папір не довше ніж на 15 хвилин. Не допускати висихання лунок.
- Стандартне розведення на планшеті для мікролунок (Альтернативно стандартне розведення можна приготувати в пробірках – див. 9.5.1. Зовнішнє стандартне розведення):
Додайте 100 мкл буфера для аналізу (1x) у двох примірниках до всіх стандартів. Внесіть піпеткою 100 мкл підготовленого стандарту (див. Підготовка стандарту 9.5., концентрація = 400 пг/мл) у двох примірниках в лунки A1 та A2 (див. таблицю 1). Змішайте вміст лунок A1 та A2 шляхом повторної аспірації та викиду (концентрація стандарту 1, S1 = 200 пг/мл) і перенесіть 100 мкл у лунки B1 та B2 відповідно (див. малюнок 7). Слідкуйте за тим, щоб не подрпати внутрішню поверхню мікролунок. Продовжуйте цю процедуру 5 разів, створюючи два ряди стандартних розведень ІЛ-10 людини в діапазоні від 200,0 до 3,1. пг/мл. Видаліть 100 мкл вмісту з останніх використаних мікролунок (G1, G2).

Малюнок 7



У разі зовнішнього стандартного розведення (див. 9.5.1.), внесіть піпеткою 100 мкл цих стандартних розведень (S1 - S7) у стандартні лунки відповідно до таблиці 1.

Таблиця 1

Таблиця, що зображує приклад розташування бланків, стандартів і зразків у стріпах мікролунок:

	1	2	3	4
А	Стандарт 1 (200,0 пг/мл)	Стандарт 1 (200,0 пг/мл)	Зразок 1	Зразок 1
Б	Стандарт 2 (100,0 пг/мл)	Стандарт 2 (100,0 пг/мл)	Зразок 2	Зразок 2
С	Стандарт 3 (50,0 пг/мл)	Стандарт 3 (50,0 пг/мл)	Зразок 3	Зразок 3
Д	Стандарт 4 (25,0 пг/мл)	Стандарт 4 (25,0 пг/мл)	Зразок 4	Зразок 4
Е	Стандарт 5 (12,5 пг/мл)	Стандарт 5 (12,5 пг/мл)	Зразок 5	Зразок 5
Ф	Стандарт 6 (6,3 пг/мл)	Стандарт 6 (6,3 пг/мл)	Зразок 6	Зразок 6
Г	Стандарт 7 (3,1 пг/мл)	Стандарт 7 (3,1 пг/мл)	Зразок 7	Зразок 7
Х	Бланк	Бланк	Зразок 8	Зразок 8

- d. Додайте 100 мкл буфера для аналізу (1x) у дублікатах у лунки бланк.
- e. Додайте 50 мкл буфера для аналізу (1x) у лунки зразка.
- f. Додайте по 50 мкл кожного зразка в двох примірниках у лунки для зразків.
- g. Приготуйте біотин кон'югат (див. Приготування кон'югату біотин9.3).
- h. Додайте 50 мкл біотин-кон'югату в усі лунки.
- i. Накрийте клейкою плівкою та інкубуйте при кімнатній температурі (18-25°C) протягом 2 годин, якщо є на шейкері для мікропланшетів.
- j. Приготуйте Стрептавідин-HRP (див. Приготування Стрептавідин-HRP9.4).
- k. Зніміть клейку плівку та спорожніть лунки. Промийте стріпи з мікролунками 3 рази відповідно до пункту b протоколу випробування. Негайно переходьте до наступного кроку.
- l. Додайте 100 мкл розведеного Стрептавідин-HRP у всі лунки, включаючи пусті лунки.
- m. Накрити клейкою плівкою та інкубувати при кімнатній температурі (18°-25°C) протягом 1 години, якщо є, на шейкері для мікропланшетів.
- n. Зніміть клейку плівку та спорожніть лунки. Промийте стріпи з мікролунками 3 рази відповідно до пункту b протоколу випробування. Негайно переходьте до наступного кроку.
- o. Внесіть піпеткою 100 мкл розчину субстрату ТМБ у всі лунки. Інкубуйте стріпи з мікролунками при кімнатній температурі (від 18° до 25°C) приблизно 10 хвилин. Уникайте прямого впливу інтенсивного світла.

Слід контролювати розвиток кольору на планшеті та зупиняти реакцію субстрату (див. наступний пункт цього протоколу) до того, як позитивні лунки більше не будуть належним чином записані. Визначення ідеального періоду часу для розвитку кольору має проводитися окремо для кожного аналізу.

Рекомендується додавати стоп-розчин, коли найвищий стандарт має темно-синій колір. Як альтернатива, розвиток кольору можна контролювати за допомогою рідера ІФА при 620 нм. Реакцію субстрату слід припинити, як тільки Стандарт 1 досягне ОГ 0,9 – 0,95.

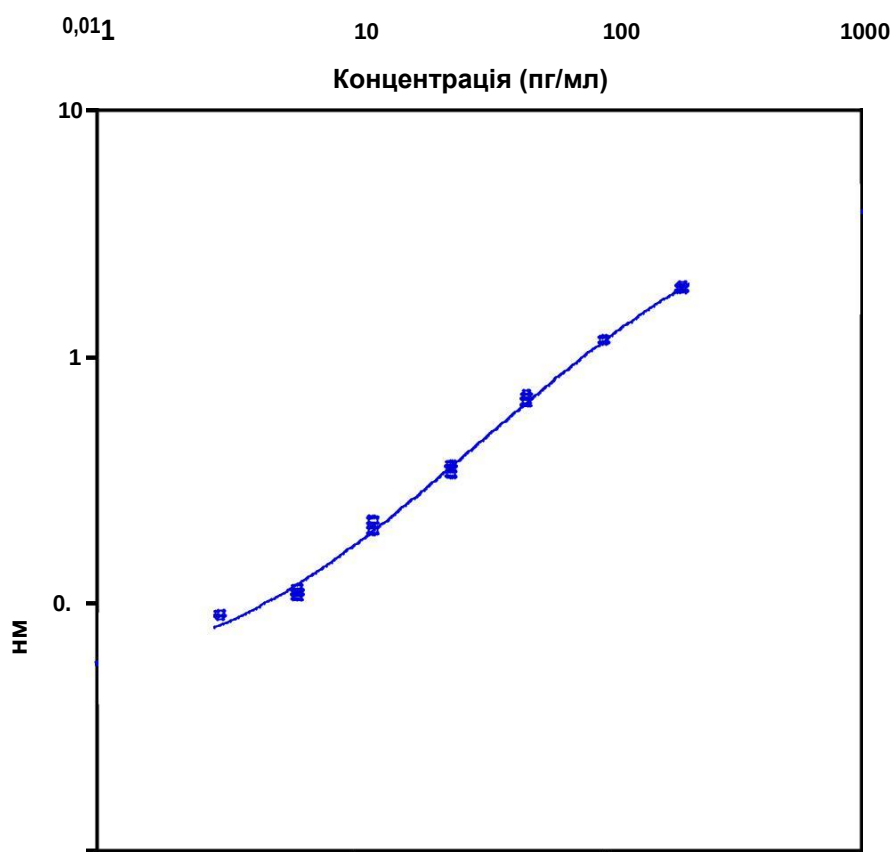
- p. Зупиніть ферментну реакцію, швидко ввівши 100 мкл стоп-розчину в кожну лунку. Важливо, щоб стоп-розчин швидко і рівномірно розподілявся по мікролунках, щоб повністю інактивувати фермент. Результати необхідно зчитувати відразу після додавання стоп-розчину або протягом однієї години, якщо мікролункові стріпи зберігаються при 2-8°C у темряві.

- q. Зчитуйте поглинання кожної мікролунки на спектрофотометрі, використовуючи 450 нм як довжину первинної хвилі (за бажанням 620 нм як референтну довжину хвилі; допустимо від 610 нм до 650 нм). Запустіть рідер планшетів згідно з інструкціями виробника, використовуючи лунки бланк. Визначте поглинання як зразків, так і стандартів.

11 Розрахунок результатів

- Обчисліть середні значення поглинання для кожного набору повторюваних стандартів і зразків. Дублікати мають бути в межах 20 відсотків середнього значення.
- Створіть стандартну криву, побудувавши середнє поглинання для кожної стандартної концентрації на ординаті проти концентрації людського IL-10 на осі абсцис. Намалюйте криву найкращої відповідності через точки графіка (рекомендується підгонка кривої з 5 параметрами).
- Щоб визначити концентрацію циркулюючого IL-10 людини для кожного зразка, спочатку знайдіть середнє значення поглинання на ординаті та проведіть горизонтальну лінію до стандартної кривої. У точці перетину протягніть вертикальну лінію до осі абсцис і зчитайте відповідну концентрацію IL-10 людини.
- **Якщо були дотримані інструкції в цьому протоколі, зразки були розведені у співвідношенні 1:2 (50 мкл зразка + 50 мкл буфера для аналізу (1x)), а концентрацію, зчитану зі стандартної кривої, необхідно помножити на коефіцієнт розведення (x 2).**
- **Розрахунок зразків із концентрацією, що перевищує стандартний 1, може призвести до неправильного низького рівня IL-10 людини. Такі зразки потребують додаткового зовнішнього попереднього розведення відповідно до очікуваних значень IL-10 людини за допомогою буфера для аналізу (1x), щоб точно визначити фактичний рівень IL-10 людини.**
- Пропонується, щоб кожна установа для тестування створювала контрольний зразок з відомою концентрацією IL-10 людини і запускала цей додатковий контроль з кожним аналізом. Якщо отримані значення виходять за межі очікуваного діапазону контролю, результати аналізу можуть бути недійсними.
- Типова стандартна крива показана на малюнку 8. Цю криву не можна використовувати для отримання результатів тесту. Кожна лабораторія повинна підготувати стандартну криву для кожної групи аналізованих мікролункових стріпів.

Малюнок 8 Типова стандартна крива для ІФА на інтерлейкін-10. IL-10 людини розводили послідовно 2 рази в Буфері для аналізу (1x). Примітка: не використовуйте цю стандартну криву для отримання результатів тесту. Для кожної групи мікролункових стріпів необхідно провести стандартну криву.



Таблиця 2

Типові дані за допомогою ІФА на інтерлейкін-10

Вимірвальна довжина хвилі: 450 нм

Референтна довжина хвилі: 620 нм

Стандарт	ІЛ-10 людини Концентрація (пг/мл)	ОГ при 450 нм	Середня ОГ при 450 нм	CV (%)
1	200,0	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	0,019 0,021	0,020	5.0

Значення ОГ стандартної кривої можуть змінюватися залежно від умов виконання аналізу (наприклад, оператор, техніка піпетування, техніка промивання або температурний вплив). Крім того, термін придатності набору може впливати на ферментативну активність і, таким чином, на інтенсивність кольору. Виміряні значення все ще дійсні.

12 Обмеження

- Оскільки точні умови можуть відрізнятися від аналізу до аналізу, стандартна крива повинна бути встановлена для кожного запуску.
- Бактеріальне або грибкове забруднення зразків або реагентів, або перехресне забруднення між реагентами, може призвести до помилкових результатів.
- Перевагу віддають одноразовим наконечникам для піпеток, колбам або скляному посуду, багаторазовий скляний посуд перед використанням необхідно вимити та ретельно промити від усіх миючих засобів.
- Неправильне або недостатнє промивання на будь-якому етапі процедури призведе до хибнопозитивних або помилково негативних результатів. Повністю спорожніть лунки перед подачею свіжого промивного розчину, заповніть буфером для промивання, як зазначено для кожного циклу промивання, і не дозволяйте лункам залишатися відкритими або висихати протягом тривалого часу.
- Застосування радіоімунотерапії значно збільшило кількість зразків з антитілами IgG людини (НАМА) анти-мишачими. НАМА може перешкоджати аналізам з використанням мишачих моноклональних антитіл, що призводить до хибнопозитивних і хибнонегативних результатів. Зразки сироватки, що містять антитіла до мишачих імуноглобулінів, все ще можна аналізувати в таких аналізах, коли до зразка додають імуноглобуліни мишей (сироватка, асцитична рідина або моноклональні антитіла невідповідної специфічності).

13 Експлуатаційні характеристики

13.1 Чутливість

Межа виявлення IL-10 людини, визначена як концентрація аналіту, що призводить до поглинання, значно вище, ніж у середовища розведення (середнє значення плюс 2 стандартних відхилення), було визначено як 1,0 пг/мл (середнє з 6 незалежних аналізів).

13.2 Відтворюваність

13.2.1 В аналізі

Відтворюваність в межах аналізу оцінювали в 3 незалежних експериментах. Кожен аналіз проводили з 6 повтореннями 5 зразків сироватки, що містять різні концентрації IL-10 людини. На кожному планшеті проводили дві стандартні криві. Дані нижче показують середню концентрацію IL-10 людини і коефіцієнт варіації для кожного зразка (див. таблицю 3). Розрахований загальний коефіцієнт варіації в межах аналізу становив 3,2%.

Таблиця 3

Середня концентрація IL-10 людини і коефіцієнт варіації для кожного зразка

Зразок	Експеримент	Середній ІЛ-10 людини Концентрація (пг/мл)	Коефіцієнт варіації (%)
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 Між аналізами

Відтворюваність аналізу в межах однієї лабораторії була оцінена в 3 незалежних експериментах. Кожен аналіз проводили з 6 повтореннями 5 зразків сироватки, що містять різні концентрації IL-10 людини. На кожному планшеті проводили дві стандартні криві. Дані, наведені нижче, показують середню концентрацію IL-10 людини і коефіцієнт варіації, розрахований за 18 визначеннями кожного зразка (див. таблицю 4). Розрахований загальний міждослідний коефіцієнт варіації становив 5,6%.

Таблиця 4

Середня концентрація IL-10 людини і коефіцієнт варіації кожного зразка

Зразок	Середній ІЛ-10 людини Концентрація (пг/мл)	Коефіцієнт з Варіація (%)
1	198	4,6
2	105	6,1
3	46	1,6
4	25	6,2
5	16	9,5

13.3 Відновлення збагаченням

Відновлення збагаченням оцінювали шляхом додавання 4 рівнів IL-10 людини в об'єднану нормальну сироватку. Відновлення визначали в 3 незалежних експериментах по 4 повторення кожен. Сироватку без добавок використовували як бланк у цих експериментах.

Відновлення становило від 81% до 106% із загальним середнім відновленням 97%.

13.4 Паралелізм розведення

Чотири зразки сироватки з різними рівнями ІЛ-10 людини аналізували в серійних 2-кратних розведеннях з 4 повторами кожен.

Відновлення становило від 91% до 115% із загальним відновленням 107% (див.

таблицю 5). Таблиця 5

Зразок	Розведе ння	Очікуваний ІЛ-10 людини Концентрація (пг/мл)	Спостерігали ІЛ-10 людини Концентрація (пг/мл)	Відновлення очікуваного ІЛ-10 людини Концентрація (%)
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 зразка

13.5.1 Стабільність заморожування-відтавання

Аліквоти зразків сироватки (з добавками або без добавок) зберігали при -20°C і розморожували 5 разів, а також визначали рівні ІЛ-10 людини. Не було виявлено значної втрати імунореактивності ІЛ-10 людини при заморожуванні та розморожуванні.

13.5.2 Стабільність зберігання

Аліквоти зразків сироватки (з добавками або без добавок) зберігали при -20°C, 2-8°C, кімнатній температурі та при 37°C, а рівень ІЛ-10 людини визначали через 24 години. Під час зберігання при -20°C, 2-8°C та кімнатній температурі не було виявлено значної втрати імунореактивності людського ІЛ-10. Значна втрата імунореактивності ІЛ-10 людини (30%) була виявлена під час зберігання при 37°C через 24 години.

13.6 Порівняння сироватки та плазми

Від 2 осіб одночасно отримували сироватку, а також плазму цитрату та гепарину та тестували на ІЛ-10. Концентрації істотно не відрізнялися, і тому всі ці препарати крові придатні для використання в аналізі. Проте настійно рекомендується забезпечити однорідність препаратів крові.

13.7 Специфічність

Вплив циркулюючих факторів імунної системи оцінювали шляхом введення цих білків у фізіологічно відповідних концентраціях у сироватку, позитивну на ІЛ-10 людини. Перехресної реактивності не виявлено.

13.8 Калібрування

Імуноаналіз відкалібрований за допомогою високоочищеного рекомбінантного людського ІЛ-10, який був оцінений за міжнародним стандартним стандартом NIBSC 93/722 і, як було показано, є еквівалентним. NIBSC 93/722 визначається кількісно в міжнародних одиницях (МО), 1 МО відповідає 200 пг людського ІЛ-10.

14 Підсумок підготовки реагентів**14.1 Буфер для промивання**

Додайте концентрат промивного буфера 20x (50 мл) до 950 мл дистильованої води.

Кількість стріпів	Концентрат промивного буфера (мл)	Дистильована вода (мл)
1 - 6	25	475
1 - 12	50	950

14.2 Буфер для аналізу (1x)

Додайте концентрат буфера для аналізу 20x (5 мл) до 95 мл дистильованої води.

Кількість стріпів	Буферний концентрат для аналізу (мл)	Дистильована вода (мл)
1 - 6	2.5	47.5
1 - 12	5.0	95,0

14.3 Біотин-кон'югат

Розведіть 1:100 біотин кон'югату в буфері для аналізу (1x):

Кількість стріпів	Біотин Кон'югат (мл)	Буфер для аналізу (1x) (мл)
1 - 6	0,03	2,97
1 - 12	0,06	5.94

14.4 Стрептавідин-HRP

Розведіть стрептавідин-HRP 1:100 у буфері для аналізу (1x):

Кількість стріпів	Стрептавідин-HRP (мл)	Буфер для аналізу (1x) (мл)
1 - 6	0,06	5.94
1 - 12	0,12	11.88

14.5 Стандарт ІЛ-10 людини

Розведіть ліофілізований стандарт людського ІЛ-10 дистильованою водою. (Об'єм розчинення вказано на етикетці стандартного флакона.)

14.6 Контролі

Відновіть ліофілізовані контролі, додавши дистильовану воду (10-30 хвилин). Об'єм розчинення вказано на етикетці контрольного флакона.

15 Резюме протоколу тестування

1. Визначте необхідну кількість мікролункових стріпів.
2. Двічі промийте мікролункові стріпи промивним буфером.
3. Стандартне розведення на мікролунковому планшеті: Додайте 100 мкл буфера для аналізу (1х) у дублікатах у всі стандартні лунки. Внесіть піпеткою 100 мкл підготовленого стандарту в перші лунки та створіть стандартні розведення шляхом перенесення 100 мкл з лунки в лунку. Викиньте 100 мкл з останніх лунок. Як варіант зовнішнього стандартного розведення в пробірках (див. «Зовнішнє стандартне розведення» 9.5.1.): Нанесіть піпеткою 100 мкл цих стандартних розведень у стріпи для мікролунок.
4. Додайте 100 мкл буфера для аналізу (1х) у дублікатах у лунки бланк.
5. Додайте 50 мкл буфера для аналізу (1х) у лунки для зразків.
6. Додайте 50 мкл зразка в дублікатах у призначені лунки для зразків.
7. Приготуйте біотин-кон'югат.
8. Додайте 50 мкл біотин-кон'югату в усі лунки.
9. Накрийте стріпи з мікролунками та інкубуйте 2 години при кімнатній температурі (18°-25°C).
10. Приготуйте стрептавідин-HRP.
11. Опустіть і промийте мікролункові стріпи 3 рази промивним буфером.
12. Додайте 100 мкл розведеного Стрептавідин-HRP у всі лунки.
13. Накрийте стріпи з мікролунками та інкубуйте 1 годину при кімнатній температурі (18°-25°C).
14. Опорожніть і промийте мікролункові стріпи 3 рази промивним буфером.
15. Додайте по 100 мкл розчину субстрату ТМБ у всі лунки.
16. Інкубуйте стріпи з мікролунками приблизно 10 хвилин при кімнатній температурі (18°-25°C).
17. Додайте 100 мкл стоп-розчину в усі лунки.
18. Почистіть мікролунковий пристрій для зчитування та виміряйте інтенсивність кольору при 450 нм.

Примітка: якщо дотримувались інструкцій у цьому протоколі, зразки були розведені 1:2 (50 мкл зразка + 50 мкл буфера для аналізу (1х)), і концентрацію, зчитану зі стандартної кривої, необхідно помножити на коефіцієнт розведення (х 2). .

УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ

REF	№ Кат.:
LOT	№ Партії:
	Використати до:
	Кількість тестів:
CONC	Концентрат
LYO	Ліофілізований
IVD	Медичний пристрій для діагностики in vitro
	Оціночний набір
	Прочитайте інструкцію перед використанням
	Зберігати поодаль від джерел тепла і прямого сонячного світла.
	Зберігати при температурі:
	Виробник:
	Увага!
Умовні позначення компонентів див. у розділі «Матеріали, що входять до набору».	

СКАРГИ: Первинно скарги можна пред'явити в письмовому вигляді або усно. Згодом необхідно подати їх, включаючи хід дослідження та отримані результати, в письмовому вигляді, з аналітичних міркувань.

ГАРАНТІЯ: Гарантується відсутність у продукті дефектних матеріалів у межах відповідного терміну придатності, а також дотримання специфікацій, поданих разом із продуктом. Продукт слід використовувати за призначенням, відповідно до всіх інструкцій, наведених в інструкції з використання та в межах відповідного терміну придатності продукту. Будь-яка модифікація процедури аналізу, або обміну, або змішування компонентів різних партій може негативно вплинути на результати. Ці випадки анулюють будь-які вимоги про заміну.

ОБМЕЖЕННЯ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ: ЗА БУДЬ-ЯКИХ ОБСТАВИН РІВЕНЬ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ ВИРОБНИКА ОБМЕЖУЄТЬСЯ ЗАКУПІВЕЛЬНОЮ ВАРТІСТЮ ВКАЗАНОВОГО (-ИХ) НАБОРУ(ІВ) . ЗА ЖОДНИХ УМОВ ВИРОБНИК НЕ МАЄ НЕСТИ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ ЗА ВИПАДКОВІ ЧИ ПОБІЧНІ ЗБИТКИ, У ТОМУ ЧИСЛІ ВТРАТУ ПРИБУТКУ, ВТРАТУ ПРОДАЖ, ТРАВМИ ЛЮДЕЙ ЧИ ПОШКОДЖЕННЯ ВЛАСНОСТІ АБО ІНШІ ВИПАДКОВІ ЧИ НЕПРЯМІ ЗБИТКИ.

	IBL International GmbH	Тел .:	+ 49 (0) 40 532891 -0 Факс: -11
	Flughafenstr. 52A, 22335 Гамбург,	E-MAIL:	IBL@IBL-International.com
	Німеччина	WEB:	http://www.IBL-International.com

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua www.ivset.ua