

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО IL-6

BMS213/2 / BMS213/2TEN, Human IL-6

Каталог. №: **BMS213/2/BMS213/2TEN** Методика от **09-07-2012**
Количество: **96, 10x96** Версия **22**
Производитель: **Bender MedSystems**
GmbH, (Австрия)



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

Только для исследовательских целей

Не для использования в диагностических или терапевтических процедурах

1. НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Данный набор human IL-6 ELISA предназначен для количественного определения человеческого интерлейкина-6. **Набор предназначен только для диагностики in vitro и не должен использоваться в терапевтических целях.**

2. ВВЕДЕНИЕ

Интерлейкин-6 (IL-6) является мультифункциональным цитокином, регулирующим иммунный ответ, реакции острой фазы и гемопоз. Данный цитокин может играть центральную роль в защитных механизмах организма. Ген человеческого интерлейкина-6 локализован в хромосоме 7p21, его геномная последовательность определена. IL-6 обычно не продуцируется нормальными клетками, однако, его экспрессия легко индуцируется различными цитокинами, липополисахаридами или вирусными инфекциями. Продуктом гена IL-6 является одноцепочечный протеин с молекулярной массой 21-28 кДа, в зависимости от продуцирующих клеток. Данная гетерогенность обусловлена различными посттрансляционными модификациями (N- и O-гликозилирование, фосфорилирование). Синтезируемый предшественник IL-6 состоит из 212 аминокислотных остатков. IL-6 является плейотропным цитокином, продуцируемым различными клетками. Действие цитокина проявляется в различных тканях, вызывая индукцию роста, ингибирование роста и дифференцировку в зависимости от природы клеток-мишеней.

IL-6 участвует в:

- Индукция дифференцировки В-клеток
- Индукция синтеза острофазовых белков гепатоцитами
- Стимуляция роста клеток миеломы/плазмоцитомы/гибридомы
- Индукция IL-2 и экспрессии рецепторов к IL-2
- Пролиферация и дифференцировка Т-клеток
- Ингибирование роста клеток определенных миелоидных лейкоцитарных линий и индукция их дифференцировки в макрофаги
- Усиление IL-3-индуцированного образования колоний мультипотентных клеток гемопоэтическими стволовыми клетками индукция созревания мегакариоцитов (тромбопоэтический фактор)
- Индукция роста мезангиальных клеток
- Индукция нейродифференцировки клеток РС 12
- Индукция роста кератиноцитов (14)

Патологическая продукция IL-6 впервые была предположительно соотнесена с поликлональной В-клеточной активацией и продукцией аутоантител у пациентов с сердечной миксомой. В настоящее время считается, что IL-6 вовлечен в патогенез различных заболеваний. Таким образом, определение уровней IL-6 в сыворотке и других биологических жидкостях дает полезную информацию в различных патологических ситуациях.

Инфекции:

Биологические жидкости пациентов с острыми локальными бактериальными или вирусными инфекциями и сыворотка пациентов с грамотрицательной или грампозитивной бактериемией IL-6.

Акушерские инфекции:

IL-6 считается индикаторным цитокином при интраамниотических инфекциях.

Заболевания, ассоциированные с повреждениями иммунной системы (поликлональные В-клеточные расстройства и аутоиммунные заболевания):

Повышенный уровень циркулирующего IL-6 обнаружен у пациентов с сердечной миксомой, болезнью Кастлмана, ревматоидным артритом, IgM-гаммапатией и у пациентов со СПИД и алкогольным циррозом печени.

Пролиферативные заболевания:

Повышенный уровень IL-6 в плазме наблюдается у пациентов с псориазом и мезангиальным пролиферативным гломерулонефритом.

Неоплазии:

Повышенный системный уровень IL-6 обнаружен у пациентов с множественной миеломой, другими В-клеточными дискразиями, Т-лимфомой Леннерта, болезни Кастлмана, почечно-клеточной карциноме и различных солидных опухолях.

Воспалительные процессы:

IL-6 участвует в индукции синтеза острофазовых белков и индукции лихорадки. Повышенный сывороточный уровень IL-6 также обнаруживается у пациентов с массивными ожогами, в сыворотке и плазме как маркер возникновения послеоперационных осложнений, в сыворотке и моче реципиентов трансплантата почки перед отторжением, в сыворотке пациентов с септическим шоком и у пациентов с воспалительным артритом и травматическим артритом.

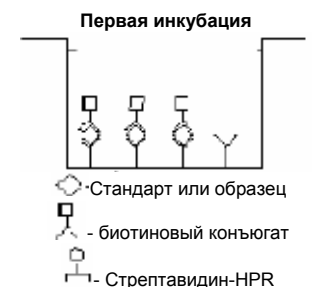
3. ПРИНЦИП ТЕСТА

Антитела, специфичные к IL-6, сорбируются в ячейках планшета.

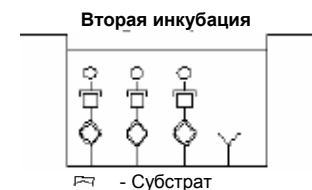


Y - моноклональные антитела

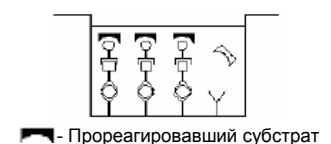
Человеческий IL-6 в образце или стандарте связывается с антителами в ячейках планшета. Добавляемая смесь конъюгатов (биотиновых античеловеческие IL-6 антитела и HRP-стрептавидин) связываются с человеческими IL-6, захваченными первым антителом.



После инкубации и промывки из ячеек удаляется не связавшийся биотиновый конъюгат и HRP-стрептавидин, и в ячейки добавляется субстратный раствор, реагирующий с HRP.



Интенсивность окраски, измеренная на длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации IL-6, присутствующего в образцах. Концентрация IL-6 в образцах определяется по стандартной кривой, построенной по 7 приготовленным разведениям стандарта.



4. ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

4.1 Реагенты в наборе Человеческий IL-6 ELISA BMS213/2 (96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к человеческому IL-6	1 планшет
Конъюгат моноклональных анти-IL-6 антител и биотина, 100 мкл	1 флакон
Конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена, 150 мкл	1 флакон
Стандарт, лиофилизированный, 200 пг/мл	2 флакона
Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20 и 10 % BSA), 5 мл	1 флакон

Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 50 мл	1 флакон
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл	1 флакон
Стоп-раствор (1М фосфорная кислота), 15 мл	1 флакон
Голубой краситель, 0,4 мл	1 флакон
Зелёный краситель, 0,4 мл	1 флакон
Плётки для заклеивания стрипов	2

4.2 Реагенты в наборе Человеческий IL-6 ELISA BMS213/2TEN (10 x 96 тестов)

Микропланшет, покрытый моноклональными антителами к человеческому IL-6	10 планшет
Конъюгат моноклональных анти-IL-6 антител и биотина, 100 мкл	10 флаконов
Конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена, 150 мкл	10 флаконов
Стандарт, лиофилизированный, 200 пг/мл	10 флаконов
Концентрат Рабочего буфера 20x (PBS с 1% Tween 20 и 10 % BSA), 5 мл	3 флакона
Промывающий раствор, концентрат 20x (PBS с 1% Tween 20), 50 мл	3 флакона
Субстратный раствор (ТМБ), 15 мл	10 флаконов
Стоп-раствор (1М фосфорная кислота), 15 мл	10 флаконов
Голубой краситель, 0,4 мл	6 флакона
Зелёный краситель, 0,4 мл	6 флакона
Плётки для заклеивания стрипов	10

5. ИНСТРУКЦИИ ПО ХРАНЕНИЮ – НАБОР ИФА

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

6. ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА

Супернатант культур клеток, человеческая сыворотка и плазма (ЭДТК, цитратная, гепариновая) плазма 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-6. Если анализ будет выполнен в ближайшие 24 часа, образцы могут храниться при 2-8 °C. Избегайте повторных циклов замораживания-размораживания образцов.

7. ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Калиброванные пипетки на 5 мл и 10 мл
- Калиброванные пипетки одноканальные переменного объема с одноразовыми наконечниками на 5 – 1000 мкл
- Многоканальные пипетки с одноразовыми наконечниками на 50 – 300 мкл
- Ванночка для реагентов для использования с многоканальной пипеткой
- Калиброванные стаканы и цилиндры, необходимые для приготовления реактивов
- Ручное или автоматическое промывающее устройство
- Микропланшетный ридер с фильтром на 450 нм и, по возможности, фильтром сравнения ≥ 620 нм
- Дистиллированная или деионизированная вода
- Миллиметровая бумага или программное обеспечение для обработки результатов (линейная регрессия)

8. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

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 °C
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.

9. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Буферные концентраты приведите к комнатной температуре и развести перед началом анализа.

Если в **Буферных концентратах** образовались кристаллы, аккуратно подогреть их до полного растворения.

9.1 Промывающий раствор (1 x)

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

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

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

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

9.2 Рабочий буфер (1 x)

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

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

Количество используемых стрипов	Концентрат Разбавителя образцов, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	2,5	47,5
1-12	5,0	95,0

9.3 Смесь Конъюгатов

Заметьте, что Смесь Конъюгатов должна быть использована в течение 30 минут после разведения.

Приготовьте необходимое количество биотинового конъюгата, разведя биотиновый конъюгат 1:100 раз рабочим буфером и HRP-стрептавидин раствора 1:50 непосредственно перед использованием в чистой пластиковой посуде, согласно таблице:

Количество используемых стрипов	Биотиновый конъюгат, мл	HRP-стрептавидин, мл	Рабочий буфер(1x) (мл)
1-6	0.03	0.06	2.91
1-12	0.06	0.12	5.82

9.4 Стандарт человеческого IL-6

Растворите лиофилизированный Стандарт IL-6 в дистиллированной воде. Необходимый объем для растворения указан на этикетке флакона, содержащего стандарт. Осторожно перемешивайте до полного растворения. Конечная концентрация полученного раствора составит 200 пг/мл.

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

Разведения стандарта могут производиться непосредственно на планшете (см. пункт 10с) или альтернативно в пробирках (см. Пункт 9.4.1)

9.4.1 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:

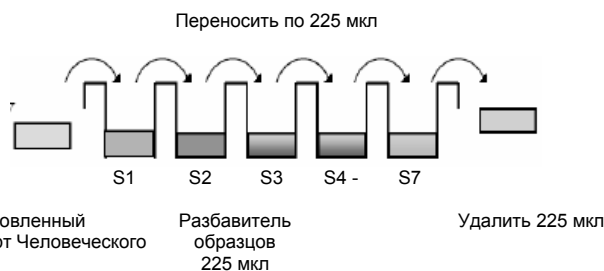
Пипетировать 225 мкл Разбавителя Образцов в каждую пробирку.

Пипетировать 225 мкл восстановленного стандарта (концентрация стандарта = 200 пг/мл) в первую пробирку, помеченную S1, и перемешать (концентрация стандарта 1 = 100 пг/мл).

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

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

Разбавитель образцов служит в качестве бланка.



9.5 Добавление окрашивающих реагентов: голубого, зеленого

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

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

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

1. Разбавитель образцов: перед разбавлением образцов добавьте **голубой краситель** в соотношении 1:250 (См. Таблицу) в рабочий раствор **Разбавителя образцов** (1x) и выполняйте дальше исследование, следуя инструкции.

5 мл Разбавителя образцов	20 мкл Голубого красителя
12 мл Разбавителя образцов	48 мкл Голубого красителя
50 мл Разбавителя образцов	200 мкл Голубого красителя

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

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

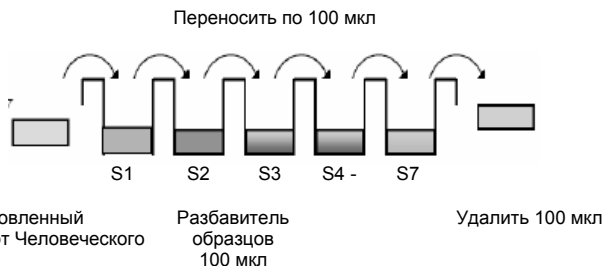
10. ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

a. Все реагенты и образцы перед началом анализа должны быть выдержаны при комнатной температуре. Жидкие реагенты тщательно перемешайте осторожным переворачиванием перед использованием, избегая образования пены.

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.

b. 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!**

c. **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 «Приготовление реагентов» 9.4) 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-6** в диапазоне от 100.0 до 1.6 пг/мл. Удалите и выбросьте 100 мкл жидкости из последних ячеек (G1, G2).



При **внешнем разведении стандарта** пипетировать 100 мкл этих разведений стандартов (S1-S2) в лунки для стандартов согласно таблице 1.

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

	1	2	3	4
A	Ст #1 (100.0 пг/мл)	Ст #1 (100.0 пг/мл)	O 1	O 1
B	Ст #2 (50.0 пг/мл)	Ст #2 (50.0 пг/мл)	O 2	O 2
C	Ст #3 (25.0 пг/мл)	Ст #3 (25.0 пг/мл)	O 3	O 3
D	Ст #4 (12.5 пг/мл)	Ст #4 (12.5 пг/мл)	O 4	O 4
E	Ст #5 (6.3 пг/мл)	Ст #5 (6.3 пг/мл)	O 5	O 5
F	Ст #6 (3.1 пг/мл)	Ст #6 (3.1 пг/мл)	O 6	O 6
G	Ст #7 (1.6 пг/мл)	Ст #7 (1.6 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 «Приготовление реагентов»).
- Добавьте по 50 мкл **биотинового конъюгата** во все ячейки.
- Закройте планшет **плёнкой** и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18–25°C), если возможно, используйте орбитальный встряхиватель, установленный на 400 об/мин.
- Снимите пленку. Полностью удалите содержимое ячеек аспирацией или декантированием (сливом). Промойте ячейки 3 раза как указано в шаге «с.» настоящего протокола. Переходите немедленно к следующему шагу.
- Внесите по 100 мкл разбавленного стрептавидинового конъюгата во все ячейки, включая бланк.
- Инкубируйте при комнатной температуре в темноте в течение примерно 10 минут. Время инкубации с субстратным раствором определяется типом используемого микропланшетного ридера. Многие ридеры способны считать оптическую плотность только до 2,0 Ед оптической плотности.

Для подобных фотометров реакция должна быть остановлена до достижения наиболее ярко окрашенными ячейками предела измерения инструмента.

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

m. Добавьте по 100 мкл **стоп-раствора** во все ячейки, включая «Бланк», чтобы полностью инактивировать фермент в ячейках.

Важно вносить стоп-реагент быстро и с той же скоростью, что и субстратный раствор. Оптическую плотность считать немедленно после внесения стоп-реагента или в течение 1 часа при условии, что стрипы находились всё это время при температуре 2-8°C в темноте.

- п. Определите оптическую плотность всех ячеек при 450 нм против «Бланка», желательнее использовать длину волны сравнения 620 нм (допустима длина волны сравнения в диапазоне 610-650 нм). Бланкируйте микропланшетный ридер согласно руководству производителя, используя ячейки «Бланк». Определите ОП как в ячейках, содержащих образцы, так и в ячейках, содержащих разведения стандарта IL-6.

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

11. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Рассчитайте результаты. Для этого рассчитайте среднее значение поглощения для каждого стандарта и образца. Отклонение от среднего не должно быть более 20%.
- Используя графическую бумагу, отметьте точки считанных значений поглощения стандартов на вертикальную ось Y, а соответствующие концентрации IL-6 на горизонтальную ось X. Проведите оптимальную кривую по точкам.
- Определите концентрации IL-6 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-6 в соответствующей пробе.
- **В ходе анализа, согласно данной инструкции, образцы были разведены 1:2, следовательно концентрации, полученные из калибровочной кривой, должны быть умножены на коэффициент разведения (x2).**
- **Замечание: расчёт образцов с оптической плотностью выше 2.0 может быть некорректен – результаты будут занижаться. Такие образцы необходимо дополнительно развести буфером для разведения и протестировать еще раз, для получения результата, отражающего точную концентрацию IL-6.**
- Подразумевается, что в каждую серию анализа включается контрольный образец с известной концентрацией IL-6. 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-6. IL-6 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.

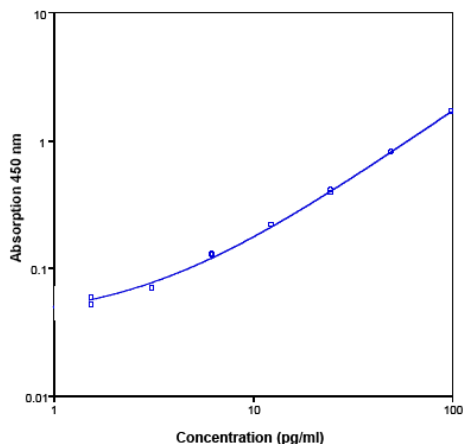


Таблица: Типичные результаты, полученные с использованием данного набора.

Измерение на 450 нм, длина волны сравнения 620 нм.

Стандарт	IL-6, пг/мл	ОП (450 нм)	ОП, среднее	CV, %
1	100.0	1.693 1.659	1.676	1.4
2	50.0	0.807 0.814	0.811	0.6
3	25.0	0.403 0.388	0.396	2.7
4	12.5	0.216 0.218	0.217	0.7
5	6.3	0.126 0.127	0.127	0.6
6	3.1	0.07 0.07	0.07	0.0
7	1.6	0.058 0.051	0.055	9.1
Бланк	0.0	0.019 0.021	0.020	5.0

ОП, полученные для стандартов, могут меняться в зависимости от условий выполнения анализа (например, температурный режим).

Кроме того, на протяжении срока годности набора энзиматическая активность, и, следовательно, интенсивность окрашивания, могут изменяться. При этом результаты тестирования остаются достоверными.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Так как условия могут меняться от анализа к анализу, стандартная кривая должна быть включена в каждую серию анализа.
- Бактериальное или грибковое загрязнение образцов или реактивов может привести к недостоверным результатам.
- Используйте одноразовые наконечники.
- Стеклопосуда должна быть тщательно вымыта.
- Неполная промывка негативно влияет на точность результатов. Полностью 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 (НАМА). 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.

13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1 Чувствительность

Минимально определяемая концентрация IL-6, определенная как концентрация аналита, дающая ОП значительно выше чем буфер для разведения (среднее плюс 2 стандартных отклонения), составила 0,7 пг/мл (среднее 6 независимых определений).

13.2 Воспроизводимость

13.2.1 Воспроизводимость внутри одной серии

Воспроизводимость внутри одной серии определялась в 3 независимых сериях анализа. В каждой серии анализа было выполнено по 6 определений каждого из 8 образцов сывороток, содержащих различные концентрации IL-6. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения IL-6 и коэффициент вариации для каждого образца. Коэффициент вариации составил в среднем 6.0 %.

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

Образец	Серия анализа	Концентрация IL-13, (пг/мл)	Коэффициент вариации, CV (%)
1	1	103.54	2.0
	2	96.85	4.2
	3	89.21	3.2
2	1	71.18	8.7
	2	69.57	4.6
	3	75.89	11.1
3	1	57.62	10.0
	2	56.01	7.4
	3	57.12	7.0
4	1	44.55	8.8
	2	46.61	5.2
	3	47.00	7.2
5	1	33.20	7.6
	2	35.89	6.3
	3	35.54	11.8
6	1	31.04	6.1
	2	31.01	2.0
	3	28.16	2.0
7	1	22.86	7.7
	2	21.58	3.2
	3	21.63	4.2
8	1	16.43	6.2
	2	19.40	3.0
	3	18.48	5.8

13.2.2 Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями в одной лаборатории определялась в 3-х независимых сериях анализа тремя разными лаборантами. В каждый серии анализа было выполнено по 6 определений каждого из 8 образцов сыворотки, содержащих различные концентрации IL-6. В каждый планшет были включены по две стандартные кривые. В таблице приведены средние значения IL-6 и коэффициент вариации для каждого образца, рассчитанный из 18 определений каждого образца. Коэффициент вариации составил в среднем 4.6 %.

Таблица 4: Среднее значение концентрации и коэффициент вариации каждого образца

Образец	Среднее значение концентрации, пг/мл	Коэффициент вариации, %
1	96.53	7.4
2	72.21	4.5
3	56.94	1.5
4	46.05	2.9
5	35.01	3.5
6	30.07	5.5
7	22.02	3.3
8	18.01	8.4

13.3 Извлечение

Извлечение оценивали тестируя образцы человеческой сыворотки, обогащенные 3 различными уровнями рекомбинантного IL-6 человека. Извлечение определяли в трех независимых экспериментах в 6 образцах сывороток. Количество эндогенного IL-6 в не обогащенной сыворотке использовали как бланк в данных экспериментах. Извлечение составило 93 % - 110% или в среднем 101 %.

13.4. Линейность

4 образца человеческой сыворотки, с различными уровнями IL-6, были проанализированы в 4 сериях двукратных разведений, по 4 повтора каждого. В таблице приведены значения извлечения (% от ожидаемого значения). Показано, что извлечение в среднем составило 109%, в диапазоне от 93 % до 123 %.

Таблица 5

Образец	Разведение	Концентрация IL-13, пг/мл		
		Ожидаемое	Наблюдаемое	% извлечения
1	1:2	--	105.5	--
	1:4	52.8	54.6	104
	1:8	27.3	28.6	105
	1:16	14.3	13.4	94
2	1:2	--	84.5	--
	1:4	42.2	46.8	110
	1:8	23.4	28.9	123
	1:16	14.4	16.5	115
3	1:2	--	40.7	--
	1:4	20.4	24.3	120
	1:8	12.2	13.2	108
	1:16	6.6	7.2	
4	1:2	--	24.7	--
	1:4	12.3	12.9	105
	1:8	6.5	7.7	119
	1:16	3.9	3.6	93

13.5 Стабильность образцов

13.5.1 Стабильность при замораживании-размораживании

Аликвоты сыворотки (без добавленного IL-6 и с добавлением IL-6) хранились при температуре -20°C и размораживались 5 раз, после чего определялись уровни IL-6. Не наблюдалось значительных потерь иммунореактивности IL-6.

13.5.2 Стабильность при хранении

Аликвоты сыворотки (без добавленного IL-6 и с добавлением IL-6) 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-12. Не наблюдалось значительных потерь иммунореактивности IL-12.

13.6 Сравнение сыворотки и плазмы

У нескольких индивидуумов сравнивались концентрации IL-6 в сыворотке и плазме, стабилизированной ЭДТА, цитратом и гепарином. Существенных различий в уровнях IL-6 в определяемых образцах не наблюдалось, следовательно, все эти образцы пригодны для анализа. Однако настоятельно рекомендуется использовать однородные образцы для унификации исследований.

13.7 Специфичность

Данный метод распознает нативный и рекомбинантный человеческий IL-6. Для определения специфичности данного метода на перекрестную реактивность были протестированы различные белки.

Перекрестную реактивность не наблюдали ни для одного из исследованных белков.

13.8 Ожидаемые значения

Панель из 24 сывороток случайно выбранных практически здоровых людей (мужчин и женщин) была протестирована на содержание IL-6. Уровень IL-6 лежал в диапазоне 0 - 44.4 пг/мл, и составил в среднем 8.2 пг/мл, со стандартным отклонением ± 12.1 пг/мл.

13.9 Калибровка

Данный метод прокалиброван по высокочистому препарату рекомбинантного IL-6, количественная оценка которого, в свою очередь, была выполнена по Международному Референсному Стандарту NIBSC 94/622 и было показано, что они эквивалентны. Стандарт NIBSC 94/622 измеряется в Международных Единицах (IU), 1IU соответствует 1 нг IL-6.

15. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ)

15.1 Промывочный буфер (1 х)

Добавить Концентрат Промывочного буфера 20x (50 мл) в 950 мл дистиллированной воды.

Количество стрипов	Концентрат Рабочего буфера, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	25	475
1-12	50	950

15.2 Рабочий буфер (1 х)

Количество стрипов	Концентрат Рабочего буфера, мл	Дистиллированная вода, мл
1-6	2,5	47,5
1-12	5,0	95,0

15.3 Смесь Конъюгатов

Приготовьте биотиновый конъюгат 1:100 и HRP-стрептавидин раствор 1:50.

Количество используемых стрипов	Биотиновый конъюгат, мл	HRP-стрептавидин, мл	Рабочий буфер(1х) (мл)
1-6	0.03	0.06	2.91
1-12	0.06	0.12	5.82

15.4 Стандарт

Растворите лиофилизированный стандарт **Рабочим буфером** (точный объем стандартного раствора, который должен получиться в результате растворения, указан на этикетке флакона).

16. ПРОТОКОЛ ТЕСТА (КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ)

1. Промыть ячейки планшета дважды **Промывочным буфером**
2. Добавьте по 100 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки, предназначенные для Стандартов (в дублях).
3. Приготовьте стандартные разведения на планшете: добавлением 100 мкл разбавленного Стандарта IL-6 в ячейки A1 и A2, создайте разведения стандарта IL-6 переносом по 100 мкл из ячейки в ячейку. Удалите и выбросьте 100 мкл жидкости из последних ячеек (G1, G2).
Альтернативное разведение стандарта в пробирках: пипетировать 100 мкл этих разведений стандарта в лунки.
4. Внесите по 100 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки «Бланк».
5. Внесите по 50 мкл **Разбавителя образцов** в ячейки, предназначенные для образцов.
6. Внесите по 50 мкл каждого **образца** в соответствующие ячейки.
7. Приготовьте **смесь конъюгатов**.
8. Добавьте по 50 мкл смеси **конъюгатов** во все ячейки.
9. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 2 часа при комнатной температуре (18 – 25°C).
10. Полностью удалите содержимое ячеек и промойте ячейки 3 раза **Промывочным буфером**.
11. Внесите по 100 мкл **Субстратного раствора ТМВ** во все ячейки, включая Бланк.
12. Инкубируйте при комнатной температуре примерно 10 минут.
13. Добавьте по 100 мкл **стоп-раствора** во все ячейки, включая Бланк.
14. Определите оптическую плотность ячеек при 450 нм против «Бланка», желательнее использовать длину волны сравнения 610-650 нм.

Замечание: Для образцов, разбавленных согласно инструкции, умножьте результат, полученный по стандартной кривой на фактор разведения 2.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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