«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«__» _____ 2022 г.
м.п.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-10
в сыворотке крови
(Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-10 в сыворотке крови «Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для определения концентрации интерлейкина-10 (ИЛ-10) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Интерлейкин-10 – противовоспалительный цитокин с молекулярной массой 18 кDa, ИЛ-10 продуцируют Т-хелперы 2 типа, CD8+-лимфоциты, макрофаги, некоторые субпопуляции дендритных клеток, эозинофилы, тучные клетки, В-клетки, моноциты, а также кератиноциты, эпителиоциты и опухолевые клетки.

1.3. Количественное определение содержания ИЛ-10 в сыворотке крови может быть использовано для диагностики и мониторинга терапии ряда заболеваний, в том числе таких заболеваний как бактериальный менингит, сепсис.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 41 неизвестного, 6 калибровочных образцов, 1 контрольного образца, всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на трехстадийном «сэндвич»-варианте твердофазного иммуно-ферментного анализа с использованием моно- и поликлональных антител к ИЛ-10 человека.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках с иммобилизованными моноклональными антителами к ИЛ-10. Имеющийся в образцах ИЛ-10 связывается с иммобилизованными антителами. Связавшийся ИЛ-10 на второй стадии взаимодействует при инкубации с конъюгатом №1 (поликлональные антитела к ИЛ-10 человека с биотином). На третьей стадии связавшийся конъюгат №1 взаимодействует при инкубации с конъюгатом №2 (стрептавидин с пероксидазой хрена).

Количество связавшегося конъюгата №2 определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы хрена – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина. Интенсивность желтого окрашивания пропорциональна концентрации содержащегося в образце ИЛ-10.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация ИЛ-10 в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

– планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к ИЛ-10, готовый для использования – 1 шт.;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– калибровочные образцы, содержащие известные количества ИЛ-10 – 0; 5; 20; 50; 200 и 500 пг/мл, аттестованные относительно WHO Reference Reagent Interleukin-10 NIBSC code: 93/722; концентрации ИЛ-10 в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, лиофилизированные – 6 флаконов;
– контрольный образец на основе инактивированной сыворотки крови человека с известным содержанием ИЛ-10, аттестованный относительно WHO Reference Reagent Interleukin-10 NIBSC code: 93/722; лиофилизированный – 1 флакон;
– конъюгат №1 (биотинилированные поликлональные антитела к ИЛ-10), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
– конъюгат №2 (стрептавидин-пероксидаза хрена), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
– раствор для восстановления калибровочных и конт-рольного образцов (РВО) – 1 флакон (7,0 мл);
– раствор для разведения образцов (РРО) – 1 флакон (13 мл);
– концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 2 флакона (по 28 мл);
– раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
– стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Принадлежности:
– пленка для заклеивания планшета – 3 шт.;
– трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;
– ванночка для реагента – 4 шт.;
– наконечники для дозатора на 2–200 мкл – 32 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител к ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-2, ИЛ-18, ИНФ-гамма, ИЛ-8, ФНО-альфа, ИНФ-альфа, ИЛ-1 бета.

3.2.* Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения концентрации ИЛ-10 в лунках, содержащих контрольный образец, не превышает 8%.

3.3.* Линейность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «линейность» – отклонение от расчетной величины концентрации ИЛ-10 при разведении калибровочных образцов, содержащих 500; 200; 50 пг/мл, в 2 раза и калибровочного образца, содержащего 20 пг/мл, в 4 раза. Процент «линейности» составляет 90–110%.

3.4.* Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации ИЛ-10 предписанной в образце, полученной путем смешивания равных объемов контрольного образца и калибровочного образца 20 пг/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5.* Чувствительность. Минимально определяемая концентрация ИЛ-10 рассчитанная на основании среднего арифметического значения из десяти измерений оптической плотности калибровочного образца B_0 (0 пг/мл) плюс 2σ (σ – среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения), не превышает 1,0 пг/мл.

3.6. Клиническая проверка. Концентрацию ИЛ-10, измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч у 110 условно здоровых мужчин и женщин в возрасте 20–50 лет. Уровень ИЛ-10 не превышал 31 пг/мл.

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации ИЛ-10, соответствующие нормальным у обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (приказ МЗ РФ от 06.06.2012 №4н).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СССР 17 января 1991 г. и в методических указаниях МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998.

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2, деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

4.8. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре 37±1°С и 600–800 об/мин;
- промывочное устройство для планшетов;
- таймер;
- холодильник бытовой;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- дозатор полуавтоматический многоканальный со сменными наконечниками, позволяющий отбирать объемы жидкостей от 5 до 350 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа использовать сыворотку крови.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови.

6.3. Для проведения анализа возможно использование образцов сыворотки крови как свежеприготовленных, так и хранившихся при температуре минус 20°С (и ниже) не более 3 месяцев или до 12 месяцев при температуре не выше минус 40°С. Повторное размораживание и замораживание образцов сыворотки крови не допускается. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10–15 мин при температуре от 18 до 25°С.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сывороток крови следует выдержать при температуре от 18 до 25°С в течение времени не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка, установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Использовать в течение 1 ч после установки. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с осушителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Хранение: при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление промывочного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) и добавить соответствующее количество дистиллированной воды.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40°С до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Хранение: при температуре от 2 до 8°С не более 5 суток.

7.4. Приготовление калибровочных образцов и контрольного образца

В каждый флакон с калибровочными образцами и контрольным образцом внести по 0,7 мл раствора для восстановления калибровочных и контрольного образцов (РВО). Выдержать при температуре от 18 до 25°С в течение 10 мин. Тщательно перемешать, избегая образования пены.

Хранение: в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°С не более 1 месяца; при температуре минус 20°С и ниже – в течение всего срока годности набора. Допускается шестикратное замораживание и размораживание образцов. После размораживания образцы тщательно перемешать, избегая образования пены.

7.5. Подготовка конъюгата №1

Конъюгат №1 готов к использованию.

Непосредственно перед использованием необходимое количество конъюгата №1 отобрать в чистый флакон или в ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА конъюгат №1 утилизировать ***(не сливать во флакон с исходным конъюгатом №1).***

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.

7.6. Подготовка конъюгата №2

Конъюгат №2 готов к использованию.

Непосредственно перед использованием необходимое количество конъюгата №2 отобрать в чистый флакон или в ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА конъюгат №2 утилизировать ***(не сливать во флакон с исходным конъюгатом №2).***

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс

Раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс) готов к использованию.

Непосредственно перед использованием необходимое количество раствора ТМБ плюс отобрать в чистый флакон или в ванночку для реагента.

Оставшийся после проведения ИФА раствор ТМБ плюс утилизировать ***(не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ плюс).***

Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидина плюс.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Хранение: после первого вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.

Внимание! *Для работы с раствором ТМБ необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому окислению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.*

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

Хранение: после вскрытия в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внести во все лунки по 100 мкл раствора для разведения образцов (РРО).

8.2. Внести в соответствующие лунки в дуб-лях по 100 мкл каждого калибровочного образца и по 100 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 100 мкл анализируемых образцов сывороток крови.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 15 мин.

8.3. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 120 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37±1°С и 700 об/мин.

8.4. По окончании инкубации снять пленку и удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (см п. 7.3), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить 350 мкл промывочного раствора в процессе промывки каждого стрипа. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. *Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения.* По окончании промывки удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата №1.

Для внесения конъюгата №1 использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.6. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37±1°С и 700 об/мин.

8.7. По окончании второй инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 5 раз, как указано в п. 8.4.

8.8. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата №2.

Для внесения конъюгата №2 использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.9. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37±1°С и 700 об/мин.

8.10. По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 5 раз промывочным раствором так, как это указано в п. 8.4.

8.11. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина плюс (см п. 7.7) и инкубировать в защищенном от света месте в течение 25 мин при температуре от 18 до 25°С.

Для внесения раствора тетраметилбензидина плюс использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

8.12. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина плюс, по 100 мкл стоп-реагента; при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

8.13. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение при длине волны 450 нм.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные, контрольный и анализируемые образцы.

9.2. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации ИЛ-10 в калибровочных образцах (пг/мл).

9.3. Определить концентрацию ИЛ-10 в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

9.4. Если концентрация ИЛ-10 в анализируемых образцах превышает 500 пг/мл, образец следует дополнительно развести раствором для разведения образцов в 20 раз (10 мкл исследуемого образца + 190 мкл раствора для разведения образцов), повторить анализ и полученный результат умножить на 20.

9.5. Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации ИЛ-10 в контрольном образце соответствует указанному диапазону концентраций на этикетке флакона.

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации ИЛ-10 в сыворотке крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средст-вах в соответствии с правилами перевозок, дейст-вующими на транспорте данного вида, при температуре от 2 до 8°С. Допускается транспортирование при температуре до 25°С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора – 18 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора;
- конъюгат №1, конъюгат №2, концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для восстановления калибровочных и контрольного образцов, раствор для разведения образцов, раствор ТМБ плюс и стоп-реагент после вскрытия можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора;
- приготовленные калибровочные образцы и контрольный образец можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°С не более 1 месяца; при температуре минус 20°С и ниже – в течение всего срока годности набора. Допускается шестикратное замораживание и оттаивание образцов;
- промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°С не более 5 суток.

10.5. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации ИЛ-10 в контрольном образце.

10.6. Для представления результатов измерений концентрации ИЛ-10 в МЕ/мл, следует использовать коэффициент пересчета 0,01
(ИЛ-10 (МЕ/мл) = 0,01 ИЛ-10 (пг/мл)).

10.7. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (раствор ТМБ плюс, ФСБ-Т×25, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

10.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора
«Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ»,
следует обращаться в АО «Вектор-Бест»
по адресу:

630559, Новосибирская область,
р.п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 227-67-64.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом.

Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

Все реагенты наборов, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

1. Обеспечение получения правильных результатов анализа

Достоверность и воспроизводимость результатов анализа зависят от выполнения следующих основных правил:

– не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгатов;

– ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и раствором ТМБ;

– избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую посуду и одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;

– рабочие поверхности столов, оборудования следует обрабатывать 70% этиловым спиртом (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);

– никогда не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и раствора ТМБ;

– перед отбором раствора ТМБ из флакона необходимо протереть конус дозатора (внутреннюю и внешнюю поверхности) сначала дистиллированной водой, а затем 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флакона;

– используйте только одноразовые наконечники для дозаторов;

– не обрабатывайте дезинфицирующими растворами и моющими средствами посуду (ванночки), используемую для работы с конъюгатом и раствором ТМБ;

– в случае повторного использования посуду (ванночки) для конъюгата необходимо промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой; посуду (ванночки) для раствора ТМБ ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой;

– если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Качество промывки лунок планшета играет важную роль для получения правильных результатов анализа:

– Для аспирации анализируемых образцов и последующей промывки рекомендуется использовать автоматическое или ручное промывочное устройство.

– Не допускайте высыхания лунок планшета в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов.

– Добивайтесь полного заполнения и опорожнения всех лунок планшета в процессе промывки. Недостаточная аспирация жидкости в процессе промывки может привести к понижению чувствительности и специфичности анализа.

– Следите за состоянием промывочного устройства – регулярно (1 раз в неделю) обрабатывайте шланги и емкости 70% этиловым спиртом.

– Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно выполните процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой.

2. Условия правильности работы набора

Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если будут выполнены следующие условия:

– соотношение оптических плотностей калибровочных образцов: $ОП_0 < ОП_5 < ОП_{20} < ОП_{50} < ОП_{200} < ОП_{500}$;

– $ОП_{500} \geq 1{,}0$ ед. опт. плотн. (о.е.);

– $ОП0 \leq 0{,}2$ о.е.;

– вычисленное по калибровочному графику значение концентрации ИЛ-10 в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

$ОП_0$, $ОП_5$, $ОП_{20}$, $ОП_{50}$, $ОП_{200}$ и $ОП_{500}$ – среднее значение оптической плотности калибровочных образцов 0, 5, 20, 50, 200 и 500 пг/мл соответственно.

3. Расчет результатов анализа

По результатам измерения вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности (ОП) в лунках с анализируемыми образцами.

Построить калибровочный график зависимости оптической плотности (ось ординат) от концентрации ИЛ-10 (ось абсцисс) в калибровочных образцах. Для этого на прилагаемом трафарете для построения графика против концентрации каждого калибровочного образца отложить соответствующее ей среднее значение оптической плотности. Последовательно соединить полученные точки отрезками прямых линий.

Пример калибровочного графика представлен на рисунке.

Для определения концентрации ИЛ-10 в анализируемых пробах на оси ординат отмечают значение оптической плотности анализируемого образца. Проводят прямую до пересечения с калибровочной кривой, от полученной точки пересечения опускают перпендикуляр на ось абсцисс. Точка пересечения и является искомым значением концентрации ИЛ-10 в образце.

Результаты, полученные для образцов, разведенных предварительно в 20 раз, умножаются на 20 (п. 9.4.).

При использовании для расчетов концентраций компьютерного или встроенного в спектрофотометр программного обеспечения в настройках выбрать метод, соответствующий кусочно-линейной аппроксимации.

4. Диагностическая значимость полученных результатов

Продукция ИЛ-10 регулируется другими цитокинами: стимулируется ИЛ-4, ИЛ-13; ИНФ-γ ингибирует выработку ИЛ-10 в моноцитах, активированных ЛПС; ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-15, ФНО-α и ИНФ-γ, напротив, индуцируют синтез ИЛ-10 в моноцитах, Т-, В, NK- и тучных клетках.

ИЛ-10 обладает мощным противовоспалительным, иммуномодулирующим, иммуносупрессивным эффектом. Главная роль ИЛ-10 – это ингибирование избыточного синтеза провоспалительных цитокинов – ИЛ-1α, ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, ФНО-α, GM-CSF, ИНФ-γ активированными макрофагами и Т-хелперами I типа. В то же время ИЛ-10 повышает активность Т-хелперов II типа и синтез продуцируемых ими цитокинов – ИЛ-4, ИЛ-10, т.е. вызывает изменение иммунного ответа с ТН1 на ТН2. ИЛ-10 обладает ауторегуляторной активностью и сильно ингибирует синтез ИЛ-10 мРНК.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Благодаря потенциальным иммуносупрессивным и противовоспалительным свойствам и благодаря широко распространенной экспрессии во многих типах клеток, ИЛ-10, по-видимому, играет важную роль при многих болезнях, включая воспаление, аутоиммунность, ангиогенез и отторжение трансплантата. ИЛ-10 играет важную роль в патогенезе рака: с одной стороны, при избыточной продукции ИЛ-10 повышается вероятность возникновения опухолей (иммуносупрессорные свойства); с другой стороны, ИЛ-10 ингибирует ангиогенез, угнетая продукцию макрофагальных ангиогенных факторов, таких как ИЛ-1β, ФНО-α, ИЛ-6 и матричной металлопротеиназы-9, и, следовательно, рост опухоли и метастазирование. ИЛ-10 может ингибировать антимикробный ответ на ранних стадиях воспаления, однако защищает организм от гипервоспаления и повреждения тканей, вызванных механизмами защиты от инфекции. Этот цитокин подавляет аллергическое воспаление путем ингибирования экспрессии провоспалительных цитокинов, хемокинов и энзимов-медиаторов воспаления. При аллергических заболеваниях, таких как астма и ринит, наблюдается недостаточная продукция ИЛ-10, зависящая от серьезности болезни.

Повышенные уровни экспрессии ИЛ-10 ассоциированы с некоторыми болезнями, такими как сепсис, бактериальный менингит, малярия, ревматоидный артрит, лепроматозная лепра, индийский висцеральный лейшманиоз и лимфатический филяриатоз. Высокий уровень ИЛ-10 в 1-е сутки ишемического инсульта может свидетельствовать о благоприятном течении и исходе заболевания. Наоборот, низкий сывороточный уровень ИЛ-10 как в начальный период, так и в динамике заболевания, позволяет прогнозировать неблагоприятное течение инсульта, значительную инвалидизацию или летальный исход. При сепсисе высокие концентрации ИЛ-10 связаны с неблагоприятным прогнозом. Отмечено, что у больных с хронической почечной недостаточностью продукция ИЛ-10 выше, чем в группе здоровых лиц, что свидетельствует об активации хелперов II типа.

Для проверки работы набора с клеточными супернатантами у здоровых доноров утром натощак забирали кровь из локтевой вены в пробирки с гепарином натрия, разводили в 5 раз полной средой RPMI 1640, культивировали 24 часа при стимуляции 10 мкг/мл ФГА и без стимуляции. Концентрации ИЛ-10 составили: (7–130) пг/мл при стимуляции и (0–50) пг/мл без стимуляции. Уровни спонтанной и ФГА индуцированной продукции цитокинов клетками цельной крови и в сыворотке условно здоровых доноров приведены в таблице 2.

5. Краткая схема проведения ИФА для набора реагентов «Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ»

Использовать только после внимательного ознакомления с инструкцией!

Внести: по 100 мкл РРО;
по 100 мкл калибровочных и контрольного образцов в дублях;
по 100 мкл анализируемых образцов в дублях.

Инкубировать: 120 мин, 700 об/мин, 37°С.

Промыть: промывочным раствором, 350 мкл, 5 раз.

Внести: по 100 мкл конъюгата №1.

Инкубировать: 60 мин, 700 об/мин, 37°С.

Промыть: промывочным раствором, 350 мкл, 5 раз.

Внести: по 100 мкл конъюгата №2.

Инкубировать: 30 мин, 700 об/мин, 37°С.

Промыть: промывочным раствором, 350 мкл, 5 раз.

Внести: по 100 мкл раствора ТМБ плюс.

Инкубировать: 25 мин, 18–25°С, в темноте.

Внести: по 100 мкл стоп-реагента.

Измерить: ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. Графические символы

REF	Номер по каталогу	IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
Σ/n	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Не стерильно
LOT	Код партии		Температурный диапазон
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до …		Обратитесь к инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению	YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 227-75-47.

---

* по ГОСТ Р 51352-2013.

Таблица1

Расход компонентов набора реагентов

Кол-во используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат №1, мл	Конъюгат №2, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, концентрат, мл	Дистил. вода, мл			
2	4.0	до 100	2.0	2.0	2.0
3	6.0	до 150	3.0	3.0	3.0
4	8.0	до 200	4.0	4.0	4.0
5	10.0	до 250	5.0	5.0	5.0
6	12.0	до 300	6.0	6.0	6.0
7	14.0	до 350	7.0	7.0	7.0
8	16.0	до 400	8.0	8.0	8.0
9	18.0	до 450	9.0	9.0	9.0
10	20.0	до 500	10.0	10.0	10.0
11	22.0	до 550	11.0	11.0	11.0
12	24.0	до 600	12.0	12.0	12.0

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 2

Уровни спонтанной и ФГА индуцированной продукции цитокинов клетками цельной крови и в сыворотке условно здоровых доноров (N = 68).

Цитокины	Спонтанная		ФГА индуцированная		Сыворотки	
	сред-нее пг/мл	диапазон пг/мл	сред-нее пг/мл	диапазон пг/мл	сред-нее пг/мл	диапазон пг/мл
ИНФ-α	1	0–6	3	0–13	0	0–5
ИЛ-4	0	0–2,4	0,24	0–24	0,2	0–4
ИНФ-γ	4	0–14	1200	165–7450	2	0–15
ИЛ-1β	50	0–107	440	50–1200	1,6	0–11
ИЛ-18	50	23–115	50	12–120	370	104–650
ИЛ-6	12	0–90	8500	100–30700	2	0–10
ФНО-α	5	1–42	1150	391–2700	0,5	0–6
ИЛ-8	2200	24–4380	16900	550–82000	2	0–10
ИЛ-10	6	0–50	40	7–130	5	0–31
ИЛ-2	0,3	0–10	155	25–590	0	0–10

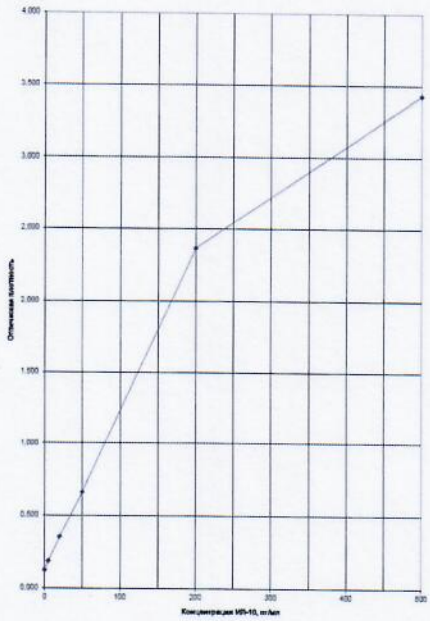


Рис. Пример зависимости оптической плотности от концентрации ИЛ-10 в калибровочных образцах.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru