

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2022 г.

М.П.



ИНСТРУКЦИЯ
по применению Набора реагентов для иммуноферментного
определения концентрации интерлейкина-18
в сыворотке крови человека
(Интерлейкин-18-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов Интерлейкин-18-ИФА-БЕСТ предназначен для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-18 (ИЛ-18) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. ИЛ-18 представляет собой протеин с молекулярной массой 18 кД, относится к семейству интерлейкина 1, является провоспалительным цитокином. Он играет важную роль в иммунных и воспалительных реакциях, и особенно представлен в некоторых аутоиммунных нарушениях.

Повышенные содержания ИЛ-18 наблюдаются при таких заболеваниях, как системная красная волчанка, острая почечная недостаточность, первичный билиарный цирроз печени, нефротический синдром, рак почки, рак мочевого пузыря, перивентрикулярная лейкомоляция, болезнь Крона, рассеянный склероз, туберкулез, язвенная болезнь желудка и сепсис.

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном «сэндвич» варианте иммуноферментного анализа с применением двух типов моноклональных антител с различной эпитопной специфичностью к ИЛ-18.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках с иммобилизованными антителами. Имеющийся в образцах ИЛ-18 связывается с иммобилизованными антителами. На второй стадии связавшийся ИЛ-18 взаимодействует при инкубации с конъюгатом №1 (антитела к ИЛ-18 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-18.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к ИЛ-18, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы на основе сыворотки крови, аттестованные относительно стандартов к ИЛ-18 (фирма MBL International, США, кат. №7620), содержащие известные количества ИЛ-18 – 0; 12,3; 37; 111; 333; 1000 пг/мл; концентрации ИЛ-18 в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов; лиофилизированные – 6 флаконов;
- контрольный образец на основе сыворотки крови с известным содержанием ИЛ-18, лиофилизированный – 1 флакон;
- конъюгат №1 (биотинилированные моноклональные антитела к ИЛ-18), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
- конъюгат №2 (стрептавидин-пероксидаза хрена), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);

- раствор для разведения образцов (РРО) – 1 флакон (13 мл);
- раствор для восстановления калибровочных и контрольного образцов (РВО) – 1 флакон (7,0 мл);
- 25-кратный 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).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 3 шт.;
- трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- ванночкой для реагента – 4 шт.;
- наконечниками для пипеток на 5–200 мкл – 32 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител к ИЛ-4, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10, ИНФ-гамма, ИЛ-8, ИЛ-17, ФНО-альфа, ИНФ-альфа, рецепторному антагонисту ИЛ-1, ИЛ-1 бета.

3.2.* Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения ИЛ-18 в конт-рольном образце не превышает 8%.

3.3.* Линейность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «линейность» – отклонение от расчетной величины концентрации ИЛ-18 при разведении калибровочных образцов, содержащих 1000; 333; 111 и 37 пг/мл ИЛ-18 в 3 раза. Процент «линейности» составляет 90–110%.

3.4.* Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации ИЛ-18 предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольного образца и калибровочного образца с концентрацией ИЛ-18 37 пг/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5.* Чувствительность – минимально определяемая концентрация ИЛ-18, рассчитанная на основании среднего арифметического значения оптической плотности калибровочного образца 0 пг/мл (B_0) плюс 2σ (среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения B_0), не превышает 2 пг/мл.

3.6. Клиническая проверка. Концентрация ИЛ-18, измеренная в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 224 условно здоровых мужчин и женщин юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20–50 лет, не превышала 261 пг/мл.

3.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации ИЛ-18, соответствующие нормальным, у обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (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 пораженный участок промыть 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 клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом 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 инфекционные, 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. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить 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 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 $37 \pm 1^\circ C$ и 600–800 об/мин;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 20, 50, 100, 250 и 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкостей до 300 мкл;
- флаконы вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- дезинфицирующий раствор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Образцы сыворотки крови человека можно хранить при температуре $2-8^\circ C$ не более 24 ч или при температуре минус $20^\circ C$ (и ниже) не более 3 мес.

Допускается хранение до 1 года при температуре не выше минус $40^\circ C$. Избегайте повторных циклов заморозки и оттаивания. Замороженные образцы должны быть быстро разморожены и тщательно перемешаны до однородной консистенции.

6.2. Образцы сывороток крови сильно гемолизированные, сильно липемичные, мутные, содержащие осадок или взвесь эритроцитов, могут давать недостоверные результаты. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать 10–15 минут при 3000 об/мин.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре от 18 до $25^\circ C$ в течение времени не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка, установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок.

Хранить при температуре от 2 до $8^\circ C$ в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление промывочного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды.

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

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

Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 сут.

7.4. Приготовление калибровочных и контрольного образцов

В каждый флакон с калибровочными и конт-рольным образцами внести по 0,7 мл раствора для восстановления калибровочных и контрольного образцов. Тщательно перемешать.

Приготовленные калибровочные и конт-рольный образцы можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 1 мес или при температуре минус 20°C и ниже в течение всего срока годности набора. Допускается шестикратное замораживание и оттаивание образцов.

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.

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

Остатки конъюгата №1 из флакона или ванночки утилизировать *(не сливать во флакон с исходным конъюгатом №1)*.

После вскрытия можно хранить в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°C 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.

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

Остатки конъюгата №2 из флакона или ванночки утилизировать *(не сливать во флакон с исходным конъюгатом №2)*.

После вскрытия можно хранить в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

7.7. Подготовка раствора 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 и поместить в защищенное от света место.

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

Утилизировать раствор тетраметилбензидина, оставшийся в ванночке или флаконе после проведения ИФА *(не сливать во флакон с исходным раствором)*.

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.

Раствор ТМБ плюс после первого вскрытия можно хранить в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

7.8. Стоп-реагент готов к использованию.

После вскрытия можно хранить в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора.

ПРОВЕДЕНИЕ ИФА

7.9. Внести во все лунки по 100 мкл раствора для разведения образцов.

7.10. 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.

Время внесения образцов не должно превышать 15 мин при использовании всех лунок планшета.

7.11. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 120 мин при встряхивании на шейкере при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и 700 об/мин.

7.12. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее 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 не менее 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. *Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого цикла промывки.* По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

7.13. Во все лунки внести по 100 мкл конъюгата №1 (см п. 7.5).

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

7.14. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин при встряхивании на шейкере при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и 700 об/мин.

7.15. По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 5 раз промывочным раствором так, как это указано в п. 7.12.

7.16. Во все лунки внести по 100 мкл конъюгата №2 (см п. 7.6).

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

7.17. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при встряхивании на шейкере при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и 700 об/мин.

7.18. По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 5 раз промывочным раствором так, как это указано в п. 7.12.

7.19. Внести во все лунки по 100 мкл раст-вора ТМБ плюс (см п. 7.7). Инкубировать в защищенном от света месте течение 25 мин при температуре от 18 до 25°C .

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

7.20. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина плюс, по 100 мкл стоп-реагента.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. 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 (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху).

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

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации ИЛ-18 в калибровочных образцах (пг/мл).

9.2. Определить содержание ИЛ-18 в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику.

9.3. Если концентрация ИЛ-18 в анализируемых образцах превышает 1000 пг/мл, образец следует дополнительно развести раствором для разведения образцов в 20 раз (20 мкл исследуемого образца + 380 мкл раствора для разведения образцов), повторить анализ и полученный результат умножить на 20.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов Интерлейкин-18-ИФА-БЕСТ должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности (18 мес). Допускается транспортирование набора при температуре до 25°C не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

Транспортирование наборов должно производиться всеми видами крытого транспорта с соблюдением условий и требований, установленных на данном виде транспорта, при температуре от 2 до 8°C. Допускается транспортирование набора при температуре до 25°C не более 10 сут.

10.2. 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°C в течение всего срока годности набора;
- приготовленные калибровочные образцы и конт-рольный образец можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°C не более 1 мес или при температуре минус 20°C и ниже в течении всего срока годности набора. Допускается шестикратное замораживание и оттаивание образцов;
- конъюгат №1, конъюгат №2, раствор ТМБ плюс, 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения образцов, раствор для восстановления калибровочных и контрольного образцов и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°C в течение всего срока годности набора;
- промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 5 сут;
- построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации ИЛ-18 в контрольном образце.

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

Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

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

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.

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.

Антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют.

Не применять набор реагентов по назначению после окончания срока годности.

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации ИЛ-18 в сыворотке крови человека, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

1. Обеспечение безопасности персонала

Обращение с материалами, контактирующими с исследуемыми образцами

Материалы, контактирующие с исследуемыми образцами, следует дезинфицировать согласно МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения» (утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998).

2. 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 конъюгатами и раствором ТМБ;
- избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую посуду и чистые 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 конъюгатов и раствора ТМБ;
- перед отбором раствора ТМБ из флакона необходимо протереть конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) сначала дистиллированной водой, а затем 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение пипеток конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флакона с раствором ТМБ;
- если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.

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.

3. Условия правильности работы набора

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

- соотношение оптических плотностей калибровочных образцов: $ОП_0 < ОП_{12,3} < ОП_{37} < ОП_{111} < ОП_{333} < ОП_{1000}$;
 - $ОП_{1000} \geq 1,0$ ед. опт. плотн. (о.е.);
 - $ОП_0 \leq 0,2$ о.е.;
 - вычисленное по калибровочному графику значение концентрации ИЛ-18 в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.
- $ОП_0$, $ОП_{12,3}$, $ОП_{37}$, $ОП_{111}$, $ОП_{333}$ и $ОП_{1000}$ – среднее значение оптической плотности калибровочных образцов 0; 12,3; 37; 111; 333 и 1000 пг/мл соответственно.

4. 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-18 (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-18 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-18 в образце.

Результаты, полученные для образцов, разведенных предварительно в 20 раз, умножаются на 20 (п. 9.3.).

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

5. Диагностическая значимость полученных результатов

Последние исследования показали контрастность функций интерлейкина-18: например, в синергизме с ИЛ-12 или ИНФ-альфа/бета вызывает усиленную продукцию цитокинов Th1 типа, таких как ИНФ-гамма, приводящих к продукции молекул, вызывающих деструкцию тканей (ФНО-альфа, окись азота, свободные радикалы кислорода). С другой стороны, в синергизме с ИЛ-2 индуцирует продукцию цитокинов Th2 типа, таких как ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13, которые могут усугублять аллергические состояния. Поэтому функции ИЛ-18

обусловлены не столько им самим, сколько усилением активности других цитокинов.

ИЛ-18 играет важную роль в иммунной защите организма против различных типов микроорганизмов и вирусов, и, подобно ИЛ-1, осуществляет связь между иммунной, эндокринной и нервной системами. ИЛ-18 регулирует позитивный и негативный баланс метаболизма костной ткани, а также деятельность хрящевых клеток и может вызвать разрушение хряща.

ИЛ-18 секретируется различными органами и тканями, включая поджелудочную железу, скелетную мышцу, кожу и почку. Активированные макрофаги продуцируют высокие уровни ИЛ-18, однако его могут нарабатывать практически все типы иммунных и неиммунных клеток. Особенно он нарабатывается в тканях при различных патологических состояниях. ИЛ-18 играет важную роль в развитии центральной нервной системы. Микроглиальные клетки вырабатывают и взаимодействуют с ИЛ-18, хотя его роль до конца не понятна.

Повышенная продукция ИЛ-18 при обширном раке кожи, таком как плоскоклеточный рак и злокачественная меланома, может дать важную информацию о понимании патогенеза рака кожи. Повышенные содержания ИЛ-18 наблюдались в сыворотке пациентов с различными формами рака, причем повышение ИЛ-18 коррелирует с прогрессированием заболевания и развитием метастазирования. Однако в этих случаях не наблюдается увеличения уровней ИНФ-гамма. В настоящее время пока неизвестно, играют ли высокие уровни ИЛ-18 в сыворотке больных раком эффективную роль в защите самих пациентов, или, наоборот, способствуют усиленному росту опухоли. С одной стороны, ИЛ-18 усиливает экспрессию Fas-лиганда на естественных киллерах и Т-лимфоцитах, усиливает продукцию ИНФ-гамма, ингибирует рост кровеносных сосудов в опухолевых тканях, что вызывает противоопухолевую активность. С другой стороны он стимулирует также выработку хемокинов, например ИЛ-8, что может спровоцировать метастазирование опухоли. Повышенные содержания ИЛ-18 наблюдались также при таких заболеваниях, как гемофагоцитоз, системная красная волчанка, легочный саркоидоз, первичный билиарный цирроз печени, нефротический синдром, атопический дерматит, полиневропатия, корковый паралич, проказа, болезнь Крона, миастения, рассеянный склероз, в хрящах больных остеоартритом, в синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом, в цереброспинальной жидкости больных менингоэнцефалитом, в бронхоальвеолярном лаваже при сепсисе.

Мониторинг концентраций различных цитокинов и их соотношения в биологических жидкостях, биоптатах тканей и способности МПК к индукции цитокинов позволяет выявить тип иммунного ответа организма на конкретное заболевание – инфекционное, атопическое, аутоиммунное и др., и индивидуально подходить к назначению адекватной противовоспалительной и иммунокорректирующей терапии.

Уровни спонтанной и ФГА индуцированной продукции цитокинов клетками цельной крови и в сыворотке условно здоровых доноров приведены в таблице 2.

6. Краткая схема проведения ИФА для набора реагентов «Интерлейкин-18-ИФА-БЕСТ»

Использовать только после внимательного ознакомления с инструкцией!

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

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

Промыть: промывочным раствором,
350 мкл, 5 раз.

Внести: по 100 мкл конъюгата №1.

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

Промыть: промывочным раствором,
350 мкл, 5 раз.

Внести: по 100 мкл конъюгата №2.

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

Промыть: промывочным раствором,
350 мкл, 5 раз.

Внести: по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.

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

Внести: по 100 мкл стоп-реагента.

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

Таблица 1

Расход компонентов набора реагентов

Кол-во используе- мых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат №1, мл	Конъюгат №2, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, 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

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	
	среднее пг/мл	диапазон пг/мл	среднее пг/мл	диапазон пг/мл	среднее 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-1 β	50	0–107	440	50–1200	1,6	0–11
ИЛ-1РА	450	20–1740	1700	67–7450	520	50–1000
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

* по ГОСТ Р 51352-99

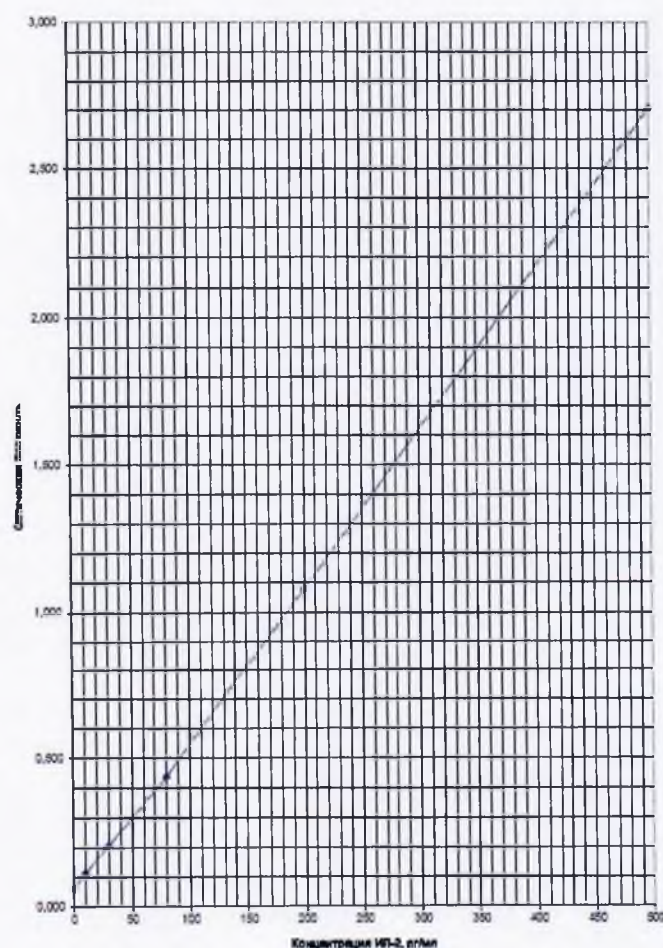


Рис. Пример зависимости оптической плотности от концентрации ИЛ-18 в калибровочных образцах.

Графические символы

	Изготовитель		Дата изготовления
	Код партии		Обратитесь к инструкции по применению
	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению.		Использовать до....
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Температурный диапазон
	Не стерильно		Не допускать воздействия солнечного света

**По вопросам, касающимся качества набора
«Интерлейкин-18-ИФА-БЕСТ»,
следует обращаться в АО «Вектор-Бест»
по адресу:**

630559, Новосибирская область,
Новосибирский район,
п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 227-67-64,
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

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