



IL-6-ELISA

KAP1261

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

History

Summary of change:

Current Version:
230123
New logo



en

Read entire protocol before use.

IL-6-ELISA

I. INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the in vitro quantitative measurement of human interleukin-6 (IL-6) in serum.

II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name : DIAsource IL-6-ELISA Kit
- B. Catalogue number : KAP1261 : 96 tests
- C. Manufactured by : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological activities

Human Interleukin 6 (IL-6) is a 184 A.A. polypeptide with potential O and N-glycosylation sites, and a significant homology with G-CSF. It is produced by various cells, including T- and B-cells, monocytes, fibroblasts, keratinocytes, endothelial cells, mesangial cells, astrocytes, bone marrow stroma cells and several tumor cells. It regulates the growth and differentiation of various cell types with major activities on the immune system, hematopoiesis, and inflammation. These multiple actions are integrated within a complex cytokine network, where several cytokines induce (IL-1, TNF, PDGF, IFNs,...) or are induced by IL-6 and the final effects result from either synergistic or antagonistic activities between IL-6 and the other cytokines (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IFN γ , IL-3, GM-CSF, M-CSF, CSF,...). IL-6 induces final maturation of B-cells into antibody producing cells and is a potent growth factor for myeloma/plasmacytoma cells. It (co-) stimulates T-cell growth and cytotoxic T-cell differentiation. It promotes megakaryocyte development and synergizes with other cytokines to stimulate multipotent hematopoietic progenitors. It can also induce differentiation and growth inhibition of some leukemia -or non hematopoietic tumoral cell lines. IL-6 is also a major inducer of the acute phase reactions in response to inflammation or tissue injury. Along with IL-1 and TNF, it induces the synthesis of acute phase proteins (APP) by hepatocytes, each cytokine or combination of cytokines showing a preferential pattern of APP production. IL-6 also interacts with the neuroendocrine system, e.g. by inducing ACTH production. Thus, IL-6 is a pleiotropic cytokine with multiple endocrine, paracrine and possibly autocrine activities in various tissues.

B. Clinical application

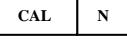
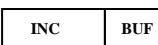
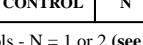
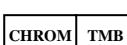
Although most normal controls have undetectable levels of IL-6 in their serum, huge quantities of IL-6 are detected in severe inflammatory situations such as septicemia. The elevation of serum IL-6 precedes that of acute phase proteins, e.g. in a postoperative phenomenon, and may thus be a sensitive early parameter to investigate inflammatory conditions.

Serum IL-6 has already been described in association with surgical or traumatic tissue injuries, infectious diseases, auto-immune diseases including arthritis, graft rejection, alcoholic liver cirrhosis, malignancies, etc.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DiaSource IL-6-ELISA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on microtiterplate. The assay uses monoclonal antibodies (MAbs) directed against distinct epitopes of IL-6. Calibrators and samples react with the capture monoclonal antibody (MAb 1) coated on microtiter well and with a monoclonal antibody (MAb 2) labelled with horseradish peroxidase (HRP). After an incubation period allowing the formation of a sandwich: coated MAb 1 – human IL-6 – MAb 2 – HRP, the microtiterplate is washed to remove unbound enzyme labelled antibody. Bound enzyme-labelled antibody is measured through a chromogenic reaction. Chromogenic solution (TMB) is added and incubated. The reaction is stopped with the addition of Stop Solution and the microtiterplate is then read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is proportional to the IL-6 concentration. A calibration curve is plotted and IL-6 concentration in samples is determined by interpolation from the calibration curve. The use of the ELISA reader (linearity up to 3 OD units) and a sophisticated data reduction method (polychromatic data reduction) result in a high sensitivity in the low range and in an extended calibration range.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 tests Kit	Color Code	Reconstitution
 Microtiterplate with 96 anti-IL-6 (monoclonal antibodies) coated wells	96 wells	blue	Ready for use
 Conjugate: HRP labelled anti-IL-6 (monoclonal antibodies) in Borate buffer with bovine serum albumin and thymol	1 vial 11 ml	red	Ready for use
 Calibrator N = 0 to 5 (see exact values on vial labels) in human plasma with bovine serum albumin, benzamidin and thymol	6 vials lyophil.	yellow	Add 1 ml distilled water
 Specimen Diluent: human plasma with bovine serum albumin, benzamidin and thymol	2 vials lyophil.	black	Add distilled water (see on the label for the exact volume)
 Incubation buffer: Borate buffer with bovine serum albumin, benzamidin and thymol	1 vial 11 ml	black	Ready for use
 Wash Solution (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	brown	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
 Controls - N = 1 or 2 (see exact values on vial labels) in human plasma with thymol	2 vials lyophil.	silver	Add 1 ml distilled water
 Chromogenic TMB Solution	1 vial 25 ml	white	Ready for use
 Stop Solution: HCl 2N	1 vial 12 ml	white	Ready for use

Note: 1. Use Specimen Diluent for sample dilutions.
 2. 1 pg of the calibrator preparation is equivalent to 100 miU of the NIBSC 1st IS 89/548.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

1. High quality distilled water
2. Pipettes for delivery of: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml and 10 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Horizontal microtiterplate shaker capable of 700 rpm ± 100 rpm
6. Washer for Microtiterplates
7. Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm, 490 nm and 650 nm (in case of polychromatic reading) or capable of reading at 450 nm and 650 nm (bichromatic reading)
8. Optional equipment: The ELISA-AID™ necessary to read the plate according to polychromatic reading (see paragraph XI.A.) can be purchased from Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 02174 USA.

VII. REAGENT PREPARATION

- A. **Calibrators:** Reconstitute the calibrators with 1 ml distilled water.
- B. **Controls:** Reconstitute the controls with 1 ml distilled water.
- C. **Specimen Diluent:** Reconstitute Specimen Diluent to the volume specified on the vial label with distilled water
- D. **Working Wash solution:** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 199 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (200x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the vial label, if kept at 2 to 8°C.
- Unused strips must be stored, at 2-8°C, in a sealed bag containing a desiccant until expiration date.
- After reconstitution, calibrators, controls and Specimen Diluent are stable for 4 days at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 2 months. Avoid successive freeze thaw cycles.
- The concentrated Wash Solution is stable at room temperature (18-25°C) until expiration date.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, the conjugate is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum must be removed as soon as possible from the clot of red cells after clotting and centrifugation, and kept at 4°C. If the samples are not used immediately, they must be kept at -20°C for maximum 2 months, and at -70°C for longer storage (maximum one year).
- Avoid subsequent freeze thaw cycles.
- Prior to use, all samples should be at room temperature (18-25°C). It is recommended to vortex the samples before use.
- Sampling conditions can affect values, therefore, strict precautions have to be taken during sampling to avoid impurities contained in sampling materials that would stimulate IL-6 production by blood cells and thus falsely increase serum IL-6 values.
- Collection tubes must be pyrogen-free.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

- Do not use the kit or components beyond expiry date.
- Do not mix materials from different kit lots.
- Bring all the reagents to room temperature (18-25°C) prior to use.
- Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
- Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
- Use a clean plastic container to prepare the Wash Solution.
- In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
- For the dispensing of the Chromogenic Solution and the Stop Solution avoid pipettes with metal parts.
- High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.

Respect the incubation times.

To avoid drift, the time between pipetting of the first calibrator and the last sample must be limited to the time mentioned in section XIII paragraph E (Time delay).

Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

Dispense the Chromogenic Solution within 15 minutes following the washing of the microtiterplate.

During incubation with Chromogenic Solution, avoid direct sunlight on the microtiterplate.

Each well can only be used once.

B. Procedure

1. Select the required number of strips for the run. The unused strips should be resealed in the bag with a desiccant and stored at 2-8°C.
2. Secure the strips into the holding frame.
3. Pipette 50 µl of Incubation Buffer into all the wells
4. Pipette 100 µl of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
5. Incubate for 1 hour at room temperature (18-25°C) on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm.
6. Aspirate the liquid from each well.
7. Wash the plate 3 times by:
 - Dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well
 - Aspirating the content of each well
8. Pipette 100 µl of anti-IL-6-HRP conjugate and 50 µl specimen diluent into all the wells.
9. Incubate for 1 hour at room temperature (18-25°C) on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm.
10. Aspirate the liquid from each well.
11. Wash the plate 3 times by:
 - Dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well
 - Aspirating the content of each well
12. Pipette 200 µl of the Chromogenic Solution into each well within 15 minutes following the washing step.
13. Incubate the microtiterplate for 15 minutes at room temperature (18-25°C) on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm, avoid direct sunlight.
14. Pipette 100 µl of Stop Solution into each well.
15. Read the absorbencies at 450 nm and 490 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 3 hours and calculate the results as described in section XI.

XI. CALCULATION OF RESULTS

A. Polychromatic Reading:

1. In this case, the ELISA-AID™ software will do the data processing.
2. The plate is first read at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
3. A second reading is performed at 490 nm against the same reference filter.
4. The ELISA-AID™ Software will drive the reader automatically and will integrate both readings into a polychromatic model. This technique can generate OD's up to 10.
5. The principle of polychromatic data processing is as follows:
 - $X_i = \text{OD at } 450 \text{ nm}$
 - $Y_i = \text{OD at } 490 \text{ nm}$
 - Using a standard unweighted linear regression, the parameters A & B are calculated : $Y = A*X + B$
 - If $X_i < 3$ OD units, then X calculated = X_i
 - If $X_i > 3$ OD units, then X calculated = $(Y_i - B)/A$
 - A 4-parameter logistic curve fitting is used to build up the calibration curve.
 - The IL-6 concentration in samples is determined by interpolation on the calibration curve.

B. Bichromatic Reading

1. Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
2. Calculate the mean of duplicate determinations.
3. Plot the OD values (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of IL-6 (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points.
4. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
5. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

IL-6-ELISA		OD units Polychromatic model
Calibrator	0 pg/ml 23.3 pg/ml 68 pg/ml 201 pg/ml 633 pg/ml 2560 pg/ml	79 125 193 408 1036 3579

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection Limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations above the average OD at zero binding, was 2 pg/ml.

B. Specificity

No significant cross-reaction was observed in presence of 50 ng of IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , LIF, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, OSM, RANTES, TGF- β , TNF- α and TNF- β . A very tenuous cross-reaction (0.06%) is observed with G-CSF.

Interference with the soluble Receptors (sIL6R and sgp-130)

No significant cross-reaction was observed in presence of 100 ng of sIL6 Receptor and sgp-130.

IL6 conc (pg/ml)	IL6 measured with 100 ng/ml of sIL6R (pg/ml)	IL6 measured with 100 ng/ml of sgp-130 (pg/ml)
7.5	4.3	8.3
74.0	81.8	76.0
678.0	734.0	671.0

No interference was observed.

C. Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	$\text{\bar{x}} \pm \text{SD}$ (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	$\text{\bar{x}} \pm \text{SD}$ (pg/ml)	CV (%)
A	20	147 ± 6.1	4.2	A	20	114 ± 5	4.4
B	20	623 ± 27	4.3	B	20	270 ± 15	5.4

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST

Sample	Added IL-6 (pg/ml)	Recovered IL-6 (pg/ml)	Recovery (%)
Serum 1	1066 547 228	1035 541 234	97.1 98.9 102.6
Serum 2	1066 547 228	1110 531 250	104.1 97.1 109.6

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (pg/ml)	Measured Concent. (pg/ml)
Serum	1/1 1/2 1/4 1/8 1/16 1/32	- 483 241.5 120.8 60.4 3	966 478 247 130 54 23

Samples were diluted with Specimen Diluent.

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the calibrators have been added to the coated wells.

TIME DELAY

sample	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min
1	61	53	56	61	76
2	196	179	205	213	273
3	1584	1478	1433	1418	1533

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Controls that contain azide will interfere with the enzymatic reaction and cannot be used.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises
- It is recommended that controls be routinely assayed as unknown samples to measure assay variability. The performance of the assay should be monitored with quality control charts of the controls.
- It is good practise to check visually the curve fit selected by the computer.

XV. REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

For guidance, the results of 34 serum samples from apparently healthy persons with low CRP levels, ranged between 0 and 50 pg/ml. 31 samples obtained values below 17 pg/ml.

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with all reagents. Stop Solution contains HCl. In case of contact, wash thoroughly with water.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

For more information, see Material Safety Data Sheet (MSDS).

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. HOUSSIAU F.A. et al., (1988) **IL-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides.** Arth. Rheum., 31:784-788.
2. MOSCOVITZ H. et al., (1994) **Plasma cytokine determination in emergency department patients as predictor of bacteremia and infectious disease severity.** Critical care Medicine, 22:1102-1107.
3. SAKAMOTO K. et al., (1994) **Elevation of circulating interleukin 6 after surgery : factors influencing the serum level.** Cytokine, 6:181-186.
4. KITA Y. et al., (1994) **Evaluation of sequential serum interleukin-6 levels in liver allograft recipients.** Transplantation, 57:1037-1041.
5. LE MOINE O. et al., (1994) **Interleukin-6 : an early marker of bacterial infection in decompensated cirrhosis.** J. of Hepatology, 20:819-824.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

CALIBRATORS (μ l)	SAMPLE(S) CONTROLS (μ l)	
Incubation buffer Calibrators (0-5) Samples, Controls	50 100 -	50 - 100
Incubate for 1 hour at room temperature (18-25°C) with continuous shaking at 700 rpm. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 μ l of Wash Solution and aspirate.		
Anti-IL-6 -HRP conjugate Specimen Diluent	100 50	100 50
Incubate for 1 hour at room temperature (18-25°C) with continuous shaking at 700 rpm. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 μ l of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic Solution	200	200
Incubate for 15 min at room temperature (18-25°C) with continuous shaking at 700 rpm.		
Stop Solution	100	100
Read on a microtiterplate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (and 490 nm) versus 630 (or 650 nm)		

Diasource's Instrumentation Service can offer you the possibility of acquiring a protocol adapted for this kit to be used on the Stratec Gemini 2PS + Combo platform including protocol assay file, reagent file and tips for the good use of the kit on the instrument.

If you need any additional information please contact IVDInstrumentation@diasource.be

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

IL-6-ELISA

I. BUT DU DOSAGE

Test Immuno-enzymétrique pour la mesure quantitative in vitro de l'interleukine-6 (IL-6) humaine dans le sérum.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. Nom du produit : DIAsource IL-6-ELISA kit
- B. Numéro de catalogue : KAP1261 : 96 tests
- C. Fabriqué par : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2 B-1348 Louvain-la-Neuve Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

A Activités biologiques

L'Interleukine humaine 6 (IL-6) est un polypeptide de 184 A.A. avec des sites de glycosylation O et N potentiels, et une homologie importante avec G-CSF. Elle est produite par plusieurs cellules, y compris les cellules T- et B-, les monocytes, les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules endothéliales, les cellules mésangiales, les astrocytes, les cellules stroma de la moelle osseuse et plusieurs cellules tumorales. Elle régule la croissance et la différentiation de plusieurs types de cellules ayant une activité importante sur le système immunitaire, l'hématopoïèse et l'inflammation. Ces actions multiples sont intégrées dans un réseau complexe de cytokines, où plusieurs cytokines induisent (IL-1, TNF, PDGF, IFNs..) ou sont induites par IL-6 et les effets finaux découlent soit des activités synergiques soit antagonistes entre IL-6 et les autres cytokines (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IFN γ , IL-3, GM-CSF, M-CSF, CSF,...). L'IL-6 induit la maturation finale des cellules-B dans des cellules produisant des anticorps et représente un facteur de croissance puissant pour des cellules myélomes/plasmacites. Elle (co-)stimule la croissance des cellules-T et la différentiation des cellules-T cytotoxiques. Elle promeut un développement mégakaryocyte et opère en synergie avec d'autres cytokines pour stimuler des progéniteurs hématopoïétiques multipotents. Elle peut aussi induire la différentiation et l'inhibition de la croissance de certaines lignes de cellules leucémiques ou de cellules tumorales non hématopoïétiques. IL-6 est aussi un inducteur majeur des réactions en phase aiguë en réponse à une inflammation ou lésion des tissus. Avec l'IL-1 et TNF, il induit la synthèse des protéines de la phase aiguë (APP) par les hépatocytes, chaque cytokine ou combinaison de cytokines affichant un modèle préférentiel de production d'APP. L'IL-6 interagit également avec le système neuroendocrinien, par ex. en induisant la production d'ACTH. Ainsi, l'IL-6 est une cytokine pléiotrope avec de multiples activités endocrines, paracrines et, le cas échéant autocrines multiples dans des tissus divers.

B. Application clinique

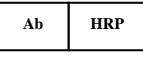
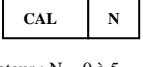
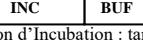
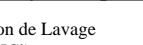
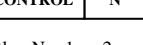
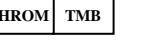
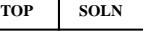
Même si la plupart des contrôles ordinaires montrent des niveaux non décelables d'IL-6 dans leur sérum, des quantités énormes d'IL-6 sont détectées lors d'inflammations graves telles que la septicémie. La hausse en IL-6 sérique précède celle des protéines en phase aiguë, par ex. dans un phénomène postopératoire, et peut donc représenter un paramètre précoce sensible pour faire des recherches sur les conditions inflammatoires.

L'IL-6 sérique a déjà été décrite en association avec des lésions chirurgicales ou traumatiques des tissus, des maladies infectieuses, des maladies auto-immunes y compris l'arthrite, des rejets de greffe, des cirrhoses alcooliques du foie, des tumeurs malignes, etc.

IV. PRINCIPES DU DOSAGE

Le kit DIAsource IL-6-ELISA est un test immunologique en phase solide à Sensibilité Enzymatique Amplifiée réalisé sur des plaques de micro-titrage. L'essai utilise des anticorps monoclonaux (MAbs) dirigés contre des épitopes distincts de l'IL-6. Les calibrateurs et les échantillons réagissent avec l'anticorps monoclonal de capture (MAb 1) enduit sur un puit de micro-titrage et avec l'anticorps monoclonal (MAb 2) marqué avec de la peroxydase de raifort (HRP). Après une période d'incubation permettant la formation d'un sandwich : MAb 1 revêtu – IL-6 humain – MAb 2 – HRP, la plaque de micro-titrage est lavée pour éliminer les anticorps marqués d'enzyme qui sont non liés. L'anticorps marqué d'enzyme lié est mesuré par le biais d'une réaction chromogénique. La solution chromogénique (TMB) est ajoutée et incubée. La réaction est arrêtée par l'ajout d'une Solution d'Arrêt et la plaque de micro-titrage est alors lue à la bonne longueur d'onde. La quantité de conversion de substrat est déterminée colorimétriquement en mesurant l'absorbance qui est proportionnelle à la concentration en IL-6. Une courbe de calibration est tracée et la concentration en IL-6 dans les échantillons est déterminée par interpolation à partir de la courbe de calibration. L'utilisation d'un lecteur ELISA (linéarité jusqu'à 3 unités D.O.) et une méthode de réduction des données sophistiquée (réduction des données polychromatiques) donnent lieu à une sensibilité élevée dans la zone de faibles concentrations et à une plage de calibration étendue.

V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	96 tests Kit	Code Couleur	Reconstitution
 Plaque de Micro-titrage avec 96 puits revêtus d'anticorps anti-IL-6 (anticorps monoclonaux)	96 puits	Bleu	Prêt à l'emploi
 Conjugué : anti-IL-6 marqué HRP (anticorps monoclonaux) dans un tampon au borate avec sérum-albumine bovine et thymol	1 flacon 11 ml	Rouge	Prêt à l'emploi
 Calibrateur : N = 0 à 5 (voir valeurs exactes sur étiquette du flacon) dans du plasma humain avec sérum-albumine bovine, benzamidine et thymol	6 flacons lyophil.	Jaune	Ajouter 1 ml d'eau distillée
 Diluant pour échantillons : plasma humain avec du sérum-albumine bovine, benzamidine et thymol	2 flacons lyophil.	Noir	Ajouter de l'eau distillée (voir l'étiquette pour le volume exact)
 Tampon d'Incubation : tampon au Borate avec du sérum-albumine bovine, benzamidine et thymol	1 flacon 11 ml	Noir	Prêt à l'emploi
 Solution de Lavage (Tris-HCl)	1 flacon 10 ml	Brun	Diluer 200 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
 Contrôle - N = 1 ou 2 (voir valeurs exactes sur étiquette du flacon) Dans du plasma humain avec thymol	2 flacons lyophil.	Argent	Ajouter 1 ml d'eau distillée
 Solution TMB Chromogénique	1 flacon 25 ml	Blanc	Prêt à l'emploi
 Solution d'Arrêt : HCl, 2 N	1 flacon 12 ml	Blanc	Prêt à l'emploi

Note: 1. Utiliser le Diluant pour échantillons pour les dilutions des échantillons.
2. 1 pg de la préparation du calibrateur équivaut à 100 mIU du NIBSC 1st IS 89/548.

VI. MATERIEL NON FOURNI

Le matériel suivant est requis mais non fourni avec le kit:

1. Eau distillée de haute qualité
2. Pipettes pour ajout de : 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml et 10 ml (il est recommandé d'utiliser des pipettes de précision avec embouts jetables)
3. Mélangeur Vortex
4. Agitateur Magnétique
5. Agitateur horizontal de plaques de micro-titrage, capacité 700 tours/m ± 100 tours/m
6. Dispositif de lavage de plaques de micro-titrage
7. Lecteur de plaques de micro-titrage capable de lire à 450 nm, 490 nm et 650 nm (en cas de lecture polychromatique) ou capable de lire à 450 nm et 650 nm (lecture bi-chromatique)
8. Équipement facultatif : Le ELISA-AID™ nécessaire pour lire la plaque selon la lecture polychromatique (voir paragraphe XI.A) peut être acheté auprès de Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. **Calibrateurs :** Reconstituer les calibrateurs avec 1 ml d'eau distillée.
- B. **Contrôles :** Reconstituer les contrôles avec 1 ml d'eau distillée.
- C. **Diluant pour échantillons :** Reconstituer le Diluant pour échantillons au volume spécifié sur l'étiquette du flacon avec de l'eau distillée
- D. **Solution de lavage de travail:** Préparer un volume adéquat de solution de lavage de travail en ajoutant 199 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (200x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Jeter la Solution de Lavage de travail non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants du kit sont stables jusqu'à la date de péremption, indiquée sur l'étiquette du flacon, si conservé à 2-8°C.
- Les barrettes inutilisées doivent être conservées à 2-8°C, dans un sachet hermétique contenant un agent déshydratant jusqu'à la date de péremption.
- Après reconstitution, les calibrateurs, les contrôles et le Diluant pour échantillons sont stables pendant 4 jours à 2-8°C. Pour des périodes de conservation plus longues, il faudra faire des aliquotes et les maintenir à -20°C pour une période maximum de 2 mois. Éviter des cycles de congélation/décongélation successifs.
- La Solution de Lavage concentrée est stable à température ambiante (18-25°C) jusqu'à sa date de péremption.
- La solution de lavage de travail préparée devrait être utilisée le même jour.
- Après sa première utilisation, le conjugué est stable jusqu'à la date de péremption, si conservé dans le flacon original bien fermé, à 2-8°C.
- Des altérations dans l'aspect physique des réactifs du kit peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Le sérum doit être éliminé le plus rapidement possible de l'agrégation de globules rouges après formation de caillots et centrifugation, et conservé à 4°C. Si les échantillons ne sont pas utilisés immédiatement, ils doivent être conservés à -20°C pendant 2 mois maximum, et à -70°C pour un stockage plus long (une année maximum).
- Éviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Avant l'emploi, tous les échantillons doivent être à température ambiante (18-25°C). Il est conseillé de mélanger au vortex les échantillons avant leur emploi.
- Les conditions d'échantillonnage peuvent influencer les valeurs, par conséquent, il faudra prendre des précautions strictes durant l'échantillonnage afin d'éviter la présence d'impuretés dans la matière d'échantillonnage qui stimulerait la production de IL-6 par les cellules sanguines et donc augmenterait faussement les valeurs d'IL-6 dans le sérum.
- Les tubes collecteurs doivent être apyrogènes.

X. MODE OPERATOIRE

Notes de manipulation

- Ne pas utiliser le kit ou les composants après la date de péremption.
- Ne pas mélanger le matériel provenant de lots de kits divers.
- Avant l'emploi, amener tous les réactifs à température ambiante (18-25°C).
- Mélanger soigneusement tous les réactifs et les échantillons en agitant ou en brassant doucement.
- Tester les calibrateurs, les contrôles et les échantillons en double. On recommande un alignement vertical.
- Pour préparer la Solution de Lavage, utiliser un récipient propre en plastique.

Afin d'éviter toute contamination croisée, utiliser un embout de pipette jetable propre pour l'ajout de chaque réactif et des échantillons.
Pour la distribution de la Solution Chromogénique et de la Solution d'Arrêt, éviter des pipettes ayant des parties métalliques.

Des pipettes à haute précision ou un système de pipetage automatisé améliorera la précision.

Respecter les temps d'incubation.

Pour éviter une dérive, le délai entre le pipetage du premier calibrateur et du dernier échantillon doit être limité au délai mentionné dans la section XIII.E (Délai de températisation).

Préparer une courbe de calibration pour chaque test, ne pas utiliser des données des tests précédents.

Distribuer la Solution Chromogénique dans les 15 minutes suivant le lavage de la plaque de micro-titrage. Durant l'incubation avec la Solution Chromogénique, éviter toute exposition directe au soleil de la plaque de micro-titrage.

Chaque puits ne peut être utilisé qu'une seule fois.

B. Mode opératoire

1. Sélectionner le nombre requis de barrettes pour le test. Les barrettes inutilisées devraient être scellées dans le sachet avec un agent déshydratant et conservées à 2-8°C.
2. Fixer les barrettes dans le cadre de support.
3. Pipetter 50 µl du Tampon d'Incubation dans tous les puits
4. Pipetter 100 µl de chaque Calibrateur, Contrôle et Échantillon dans les puits appropriés.
5. Incuber pendant 1 heure à la température ambiante (18-25°C) sur un agitateur horizontal réglé à 700 tours/m ± 100 tours/m.
6. Aspirer le liquide de chaque puit.
7. Laver la plaque 3 fois en :
 - Distribuant 0,4 ml de Solution de Lavage dans chaque puit
 - Aspirant le contenu de chaque puit
8. Pipetter 100 µl de conjugué anti-IL-6-HRP et 50 µl de Diluant pour échantillons dans tous les puits.
9. Incuber pendant 1 heure à température ambiante (18-25°C) sur un agitateur horizontal réglé à 700 tours/m ± 100 tours/m.
10. Aspirer le liquide de chaque puit.
11. Laver la plaque 3 fois en :
 - Distribuant 0,4 ml de Solution de lavage dans chaque puit
 - Aspirant le contenu de chaque puit.
12. Pipetter 200 µl de Solution Chromogénique dans chaque puits dans les 15 minutes suivant l'étape de lavage.
13. Incuber la plaque de micro-titrage pendant 15 minutes à température ambiante (18-25°C) sur un agitateur horizontal réglé à 700 tours/m ± 100 tours/m, éviter l'exposition directe au soleil.
14. Pipetter 100 µl de Solution d'Arrêt dans chaque puit.
15. Lire les absorbances à 450 nm et 490 nm (filtre de référence 630 nm ou 650 nm) dans les 3 heures et calculer les résultats tels que décrits à la section XI.

XI. CALCUL DES RESULTATS

A. Lecture Polychromatique

1. Dans ce cas, le logiciel ELISA-AID™ réalisera le traitement des données.
2. La plaque est lue initialement à 450 nm contre un filtre de référence réglé à 650 nm (ou 630 nm).
3. Une deuxième lecture est faite à 490 nm contre le même filtre de référence.
4. Le logiciel ELISA-AID™ guidera le lecteur automatiquement et intégrera les deux lectures dans un modèle polychromatique. Cette technique peut générer jusqu'à 10 D.O.
5. Le principe du traitement des données polychromatiques est le suivant:

- $X_i = D.O. \text{ à } 450 \text{ nm}$
- $Y_i = D.O. \text{ à } 490 \text{ nm}$
- En utilisant une régression linéaire standard non pondérée, les paramètres A & B sont calculés :
- $Y = A*X + B$
- Si $X_i < 3 D.O.$ unités, alors X calculé = X_i
- si $X_i > 3 D.O.$ unités, alors X calculé = $(Y_i - B)/A$
- Un ajustement logistique de la courbe à 4 paramètres est utilisé pour construire la courbe de calibration.
- La concentration en IL-6 dans les échantillons est déterminée par interpolation sur la courbe de calibration.

B. Lecture Bi-chromatique

1. Lire la plaque à 450 nm contre un filtre de référence réglé à 650 nm (ou 630 nm).
2. Calculer la moyenne des déterminations en double.
3. Tracer les valeurs D.O. (ordonnée) pour chaque calibrateur par rapport à la concentration correspondante en IL-6 (abscisse) et dessiner une courbe de calibration à travers les points des calibrateurs.
4. Lire la concentration de chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.

5. Une réduction des données assistée par ordinateur simplifiera ces calculs. Si on utilise un traitement automatique des résultats, on recommande un ajustement de la fonction logistique à 4 paramètres.

XII. DONNEES TYPES

Les données suivantes sont fournies exclusivement à titre d'illustration et ne devraient jamais être utilisées à la place de la courbe de calibration en temps réel.

IL-6-ELISA		unites D.O. Modèle polychromatique
Calibrateur	0 pg/ml 23.3 pg/ml 68 pg/ml 201 pg/ml 633 pg/ml 2560 pg/ml	79 125 193 408 1036 3579

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES

A. Limite de Détection

Vingt calibrateurs zéro ont été testés avec une série d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie en tant que concentration apparente à deux déviations standard au-dessus du D.O. moyen correspondant à une fixation à zéro, était de 2 pg/ml.

B. Spécificité

Aucune réaction croisée significative n'a été observée en présence de 50 ng de IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN-α, IFN-γ, LIF, MIP-1α, MIP-1β, MCP-1, OSM, RANTES, TGF-β, TNF-α et TNF-β. Une réaction croisée extrêmement légère (0,06%) est observée avec G-CSF.

Interférence avec les Récepteurs solubles (sIL6R et sgp-130)

Aucune réaction croisée significative n'a été observée en présence de 100 ng de Récepteur sIL6 et sgp-130.

IL6 conc. (pg/ml)	IL6 mesuré avec 100 ng/ml de sIL6R (pg/ml)	IL6 mesuré avec 100 ng/ml de sgp-130 (pg/ml)
7,5	4,3	8,3
74,0	81,8	76,0
678,0	734,0	671,0

Aucune interférence n'a été observée.

C. Précision

INTRA ESSAI				INTER ESSAI			
Sérum	N	$\bar{X} \pm SD$	CV (%)	Sérum	N	$\bar{X} \pm SD$	CV (%)
A	20	147 ± 6,1	4,2	A	20	114 ± 5	4,4
B	20	623 ± 27	4,3	B	20	270 ± 15	5,4

SD: Écart Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE RECUPERATION

Échantillon	IL-6 ajoutée (pg/ml)	IL-6 récupérée (pg/ml)	Récupération (%)
Sérum 1	1066 547 228	1035 541 234	97.1 98.9 102.6
Sérum 2	1066 547 228	1110 531 250	104.1 97.1 109.6

ESSAI DE DILUTION

Échant.	Dilution	Concent. théorique (pg/ml)	Concent. Mesurée (pg/ml)
Sérum	1/1	-	966
	1/2	483	478
	1/4	241,5	247
	1/8	120,8	130
	1/16	60,4	54
	1/32	3	23

Les échantillons ont été dilués avec du Diluant pour échantillons.

E. Délai de temporisation entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon

Tel que montré ci-dessous, les résultats de l'essai sont précis même lorsqu'un échantillon est distribué 30 minutes après que les calibrateurs aient été ajoutés aux puits revêtus.

DÉLAI DE TEMPORISATION

Echant.	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min
1	61	53	56	61	76
2	196	179	205	213	273
3	1584	1478	1433	1418	1533

XIV. CONTROLE DE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le Contrôle 1 et/ou le Contrôle 2 ne sont pas dans la plage spécifiée sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins qu'une explication satisfaisante ne soit fournie pour cet écart.
- Si on le souhaite, chaque laboratoire peut réaliser ses propres groupes d'échantillons de contrôle, qui devraient être conservés congelés en aliquotes. Les Contrôles contenant de l'azoture vont interférer avec la réaction enzymatique et ne peuvent pas être utilisés.
- Les critères d'acceptation pour la différence entre les doubles des échantillons devraient être basés sur les Bonnes Pratiques de Laboratoire
- Il est recommandé de tester les contrôles en routine en tant qu'échantillons inconnus pour mesurer la variabilité du test. La performance du test devrait être surveillée par des diagrammes de contrôle de la qualité des contrôles.
- Il est recommandé d'examiner visuellement l'ajustement de la courbe sélectionnée par l'ordinateur.

XV. INTERVALLES DE RÉFÉRENCE

Ces valeurs sont données à titre indicatif; chaque laboratoire devrait établir sa plage de valeurs normales.

À titre indicatif, les résultats de 34 échantillons de sérum de personnes apparemment en bonne santé avec des niveaux de CRP bas, étaient compris entre 0 et 50 pg/ml. 31 échantillons ont obtenu des valeurs en-dessous de 17 pg/ml.

XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

À utiliser exclusivement pour le diagnostic in vitro.

Les éléments du sang humain compris dans ce kit ont été testés par des méthodes agréées par l'Europe et/ou la FDA et on a constaté qu'ils étaient négatifs pour le HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir une assurance complète que les substances dérivées du sang humain ne transmettront pas l'hépatite, le SIDA ou d'autres infections. Par conséquent, la manipulation des échantillons de réactifs, de sérum ou de plasma devrait être conforme aux procédures de sécurité locales.

Tous les produits ou substances dérivés des animaux ont été recueillis à partir d'animaux en bonne santé. Les composants bovins proviennent de pays où la ESB n'a pas été constatée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devraient être traités comme potentiellement infectieux.

Éviter tout contact des réactifs avec la peau, la Solution d'Arrêt contient du HCl. En cas de contact, se laver soigneusement avec de l'eau.

Ne pas fumer, boire ou manger ou appliquer des produits cosmétiques dans l'espace de travail. Ne pas transférer à la pipette en utilisant la bouche. Porter des vêtements de protection et des gants jetables.

Pour plus d'informations, consultez la fiche signalétique (MSDS).

XVII. BIBLIOGRAPHIE

- HOUSSIAU F.A. et al., (1988) **IL-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides.** Arth. Rheum., 31:784-788.

- MOSCOVITZ H. et al., (1994) **Plasma cytokine determination in emergency department patients as predictor of bacteremia and infectious disease severity.** Critical care Medicine, 22:1102-1107.
- SAKAMOTO K. et al., (1994) **Elevation of circulating interleukin 6 after surgery : factors influencing the serum level.** Cytokine, 6:181-186.
- KITA Y. et al., (1994) **Evaluation of sequential serum interleukin-6 levels in liver allograft recipients.** Transplantation, 57:1037-1041.
- LE MOINE O. et al., (1994) **Interleukin-6 : an early marker of bacterial infection in decompensated cirrhosis.** J. of Hepatology, 20:819-824.

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

CALIBRATEURS (µl)	ECHANTILLON(S) CONTROLES (µl)	
Tampon d'Incubation Calibrateurs (0-5) Echantillons, Contrôles	50 100 -	50 - 100
Incuber pendant 1 heure à température ambiante (18-25°C) sous une agitation continue de 700 tours/m Aspirer le contenu de chaque puit. Laver 3 fois avec 400 µl de Solution de Lavage et aspirer.		
Conjugué anti-IL-6 -HRP Diluant pour échantillons	100 50	100 50
Incuber pendant 1 heure à température ambiante (18-25°C) sous une agitation continue de 700 tours/m Aspirer le contenu de chaque puit. Laver 3 fois avec 400 µl de Solution de Lavage et aspirer.		
Solution Chromogénique	200	200
Incuber pendant 15 min à température ambiante (18-25°C) sous une agitation continue de 700 tours/m		
Solution d'Arrêt	100	100
Lire sur un lecteur de plaque de micro-titrage et enregistrer l'absorbance de chaque puit à 450 nm (et 490 nm) contre 630 (ou 650 nm)		

Le service d'instrumentation de Diasource peut vous offrir la possibilité d'acquérir un protocole adapté à ce kit à utiliser sur la plate-forme Combo Stratec Gemini 2PS +, y compris un fichier de test de protocole, un fichier de réactifs et des conseils pour une bonne utilisation du kit sur l'instrument. Si vous avez besoin d'informations supplémentaires, veuillez contacter IVDInstrumentation@diasource.be



de

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

IL-6-ELISA

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein immunenzymetrischer Assay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem Interleukin-6 (IL-6) in Serum.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung:** DIAsource IL-6-ELISA Kit
- B. **Katalognummer:** KAP1261: 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel.: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Biologische Aktivität

Humanes Interleukin-6 (IL-6) ist ein aus 184 Aminosäuren bestehendes Polypeptid mit potentiellen O- und N-Glykosylierungsstellen und mit einer signifikante Homologie mit G-CSF. Es wird durch verschiedene Zellen, einschließlich T- und B-Zellen, Monozyten, Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen, Mesangiumzellen, Astrozyten, Knochenmark-Stromazellen und verschiedene Tumorzellen produziert. Es reguliert das Wachstum und die Differenzierung verschiedener Zelltypen mit signifikanter Auswirkungen auf das Immunsystem, die Hämatopoiese und Entzündung. Diese vielfältigen Aktivitäten sind in ein komplexes Zytokinnetzwerk eingebunden, in dem mehrere Zytokine IL-6 induzieren (IL-1, TNF, PDGF, IFNs ...) oder durch IL-6 induziert werden und die endgültigen Effekte sich durch synergistische oder antagonistische Wirkung zwischen IL-6 und anderen Zytokinen ergeben (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IFNy, IL-3, GM-CSF, M-CSF, CSF ...). IL-6 induziert die endgültige Reifung von B-Zellen zu Antikörperproduzierenden Zellen und ist ein potenter Wachstumsfaktor für Myelom-/Plasmazytomzellen. Es (co-) stimuliert T-Zellwachstum und zytotoxische T-Zell-Differenzierung. Es fördert die Entwicklung von Megakaryozyten und stimuliert in Synergie mit anderen Zytokinen multipotente hämatopoetische Vorläuferzellen. Es kann ebenso die Differenzierung und die Wachstumshemmung einiger Leukämie- oder nicht-hämatopoetischer Tumorzelllinien induzieren. IL-6 ist auch ein wichtiger Auslöser der Akute-Phase-Reaktionen als Antwort auf Entzündung oder Gewebeverletzung. Zusammen mit IL-1 und TNF induziert es die Synthese von Akutphasenproteinen (APP) durch Hepatozyten, wobei jedes Zytokin oder jede Kombination von Zytokinen durch ein spezielles Muster der APP-Produktion gekennzeichnet ist. IL-6 interagiert auch mit dem neuroendokrinen System, z. B. durch Induzieren der ACTH-Produktion. Somit ist IL-6 ein pleiotropes Zytokin, das je nach Gewebetyp vielfältige endokrine, parakrine und möglicherweise autokrine Aktivitäten aufweist.

B. Klinische Anwendung

Obwohl die meisten normalen Kontrollen nicht nachweisbare Konzentrationen an IL-6 im Serum haben, findet man große Mengen an IL-6 bei schwerwiegenden entzündlichen Zuständen wie etwa Blutvergiftung. Der Anstieg von IL-6 im Serum geht dem von Akute-Phase-Proteinen voraus, z. B. in einer postoperativen Phase, wodurch IL-6 möglicherweise ein empfindlicher, früher Parameter bei der Untersuchung entzündlicher Erkrankungen darstellt. Serum-IL-6 wurde bereits mit traumatischen Gewebsverletzungen, Infektionskrankheiten, Autoimmunerkrankungen wie Arthritis, Transplantatabstoßung, alkoholischer Leberzirrhose, Krebserkrankungen usw. in Verbindung gebracht.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DiaSource IL-6-ELISA ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay (ELISA) im Mikrotiterplattenformat. Der Assay benutzt monoklonale Antikörper (MAks), die gegen verschiedene Epitope von IL-6 gerichtet sind. Kalibratoren und Proben reagieren mit dem primären monoklonalen Antikörper (MAk 1), mit dem die Wells der Mikrotiterplatte beschichtet sind, und mit einem monoklonalen Antikörper (MAk 2), der mit Meerrettich-Peroxidase (MRP) markiert ist. Nach einer Inkubationsphase bildet sich ein Sandwich-Komplex: MAk 1 - IL-6 - MAk 2 - MRP; nicht gebundene enzymmarkierte Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Gebundene enzymmarkierte Antikörper werden durch eine Farbreaktion gemessen. Chromogene Lösung (TMB) wird hinzugefügt und inkubiert. Die Reaktion wird durch Hinzufügen einer Stopplösung beendet und die Mikrotiterplatte wird bei adäquater Wellenlänge ausgewertet. Die Menge an Substratumsatz wird kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die proportional zur IL-6-Konzentration ist.

Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die IL-6-Konzentration in den Proben wird durch Interpolation von der Kalibrationskurve bestimmt. Die Verwendung des ELISA-Lesegeräts (Linearität bis zu 3 OD-Einheiten) und eine komplexe Datenreduktionsmethode (polychromatische Datenreduktion) ergeben eine hohe Sensibilität im niedrigen Bereich und einen breiten Kalibrationsbereich.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Tests Kit	Farbe Code	Rekonstitution
 Mikrotiterplatte mit 96 anti-IL-6-beschichteten Wells	96 Wells	Blau	gebrauchsfertig
Ab HRP	1 Gefäß 11 ml	Rot	gebrauchsfertig
Konjugat: MRP markierte anti-IL-6 (monoklonaler Antikörper) in Boratpuffer mit Rinderserumalbumin und Thymol	6 Gefäße lyophil.	Gelb	1 ml destilliertes Wasser zugeben
CAL N	Dest. Wasser zugeben (das exakte Volumen bitte dem Etikett entnehmen)	Schwarz	
Kalibrator N = 0 bis 5 (genaue Werte auf Gefäßetiketten) in Humanplasma mit Rinderserumalbumin und Thymol	2 Gefäße lyophil.	Schwarz	
DIL SPE	Dest. Wasser zugeben (das exakte Volumen bitte dem Etikett entnehmen)	Schwarz	
Probenverdünner: Humanplasma mit Rinderserumalbumin, Benzamidin und Thymol	1 Gefäß 11 ml	Schwarz	gebrauchsfertig
INC BUF	1 Gefäß 11 ml	Schwarz	gebrauchsfertig
Inkubationspuffer: Boratpuffer mit Rinderserumalbumin, Benzamidin und Thymol	1 Gefäß 10 ml	Braun	200 x mit destilliertem Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
WASH SOLN CONC	2 Gefäße lyophil.	Silber	1 ml destilliertes Wasser zugeben
Waschlösung (Tris-HCl)			
CONTROL N			
Kontrollen - N = 1 oder 2 (genaue Werte auf Gefäßetiketten) in Humanplasma mit Thymol			
CHROM TMB	1 Gefäß 25 ml	Weiß	gebrauchsfertig
Chromogene TMB-Lösung			
STOP SOLN	1 Gefäß 12 ml	Weiß	gebrauchsfertig
Stopplösung: HCL 2N			

Bemerkung: 1. Benutzen Sie den Probenverdünner zur Probenverdünnung.
2. 1 pg der Kalibratorzubereitung ist äquivalent zu 100 mIU des NIBSC 1st IS 89/548.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

- Hochwertiges destilliertes Wasser
- Pipetten: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml und 10 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegplastikspitzen wird empfohlen)
- Vortex-Mixer
- Magnetrührer
- Horizontaler Schüttler für Mikrotiterplatte Kap. 700 rpm ± 100 rpm
- Waschgerät für Mikrotiterplatten
- Mikrotiterplatten-Lesegerät zur Auswertung bei 450 nm, 490 nm und 650 nm (bei polychromatischer Auswertung) oder zur Auswertung bei 450 nm und 650 nm (monochromatische Auswertung)
- Optional: ELISA-AID™ zur Auswertung der Platte nach polychromatischer Methode (siehe Abschnitt XI.A.), erhältlich bei Robert Maciel Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 1 ml destilliertem Wasser.
- Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 1 ml destilliertem Wasser.
- Probenverdünner:** Rekonstituieren Sie den Probenverdünner bis zu dem genau auf dem Etikett des Fläschchens angegebenen Volumen mit dest. Wasser
- Waschlösung:** Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (200x) mit 199 Anteilen destilliertem Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Werfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages weg.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder der Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2 °C bis 8 °C stabil.
- Nicht verwendete Mikrotiterstreifen sollten bis zum Verfallsdatum wieder dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2 bis 8 °C gelagert werden.
- Nach Rekonstitution sind die Kalibratoren, Kontrollen und Probenverdünner bei 2 bis 8 °C für 4 Tage stabil. Aliquots müssen bei längerer Aufbewahrung bei -20°C eingefroren werden, dann sind Sie 2 Monate haltbar. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Die konzentrierte Waschlösung ist bei Raumtemperatur (18-25°C) bis zum Verfallsdatum haltbar.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist das Konjugat bei Aufbewahrung im Originalgefäß bei 2 bis 8 °C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Das Serum muss so schnell wie möglich vom Blutgerinnsel der roten Zellen nach Gerinnung und Zentrifugation getrennt und bei 4°C aufbewahrt werden. Werden die Proben nicht direkt benutzt, müssen sie bei -20°C für maximal 2 Monate gelagert werden. Eine längere Lagerdauer (maximal 1 Jahr) erfordert eine Lagerung bei -70°C.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Vor Gebrauch müssen alle Proben Raumtemperatur (18-25°C) erreichen. Vortexmixen der Proben wird vor Gebrauch empfohlen.
- Die Bedingungen der Probennahme können Werte beeinflussen, weshalb strenge Vorsichtsmaßnahmen während des Sammelns ergriffen werden müssen, um Unreinheiten im gesammelten Material, die die IL-6 Produktion durch Blutzellen stimulieren und somit IL-6-Serumwerte fälschlicherweise erhöhen würden, zu vermeiden.
- Probenbehälter müssen pyrogenfrei sein.

X. DURCHFÜHRUNG

A. Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach dem Ablaufdatum.

Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur (18-25°C). Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Führen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben doppelt aus. Vertikale Ausrichtung wird empfohlen. Verwenden Sie zur Zubereitung der Waschlösung einen reinen Kunststoffbehälter. Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden. Verwenden Sie zur Pipettierung der chromogenen Lösung und der Stopplösung keine Pipetten mit Metallteilen. Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten. Zur Vermeidung von Drift muss die Zeit zwischen dem Pipettieren des ersten Kalibrators und der letzten Probe auf die Zeit beschränkt werden, die in Abschnitt XIII Absatz E (Zeitverzögerung) erwähnt wird. Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen. Pipettieren Sie die chromogene Lösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte. Während der Inkubation mit der chromogenen Lösung ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen. Jeder Brunnen kann nur einmal verwendet werden.

B. Durchführung

- Wählen Sie die erforderliche Anzahl der Streifen für den Lauf aus. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen sollten wieder dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2 bis 8 °C gelagert werden.
- Befestigen Sie die Streifen im Halterrahmen.
- Pipettieren Sie jeweils 50 µl Inkubationspuffer in alle Wells
- Pipettieren Sie jeweils 100 µl Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Wells.
- Inkubieren Sie 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) auf dem horizontalen Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm.
- Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
- Waschen Sie die Platte dreimal:
 - pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jedes Well
 - saugen Sie den Inhalt jedes Wells ab.
- Pipettieren Sie 100 µl anti-IL-6-HRP-Konjugat und 50 µl Probenverdünner in jeden Well.
- Inkubieren Sie 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) auf dem horizontalen Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm.
- Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
- Waschen Sie die Platte dreimal:
 - pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jedes Well
 - saugen Sie den Inhalt jedes Wells ab.
- Pipettieren Sie 200 µl der chromogenen Lösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jeden Well.
- Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) auf dem horizontalen Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm. Vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
- Pipettieren Sie 100 µl der Stopplösung in jedes Well.
- Werten Sie die Absorptionen bei 450 nm und 490 nm (Referenzfilter 630 nm oder 650 nm) innerhalb 3 Stunden aus und berechnen Sie die Resultate wie in Abschnitt XI beschrieben.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

A. Polychromatische Auswertung

- In diesem Fall werden die Daten durch die ELISA-AID™ Software verarbeitet.
- Die Platte wird zunächst bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) ausgewertet.
- Eine zweite Auswertung erfolgt bei 490 nm gegen denselben Referenzfilter.
- Die ELISA-AID™ Software steuert das Lesegerät automatisch und integriert beide Auswertungen in ein polychromatisches Modell. Diese Technik kann ODs bis 10 erstellen.
- Das Prinzip der polychromatischen Datenauswertung funktioniert wie folgt:
 - $X_i = \text{OD bei } 450 \text{ nm}$
 - $Y_i = \text{OD bei } 490 \text{ nm}$
 - Standard nicht gewichtet lineare Regression, Parameter A & B werden berechnet: $Y = A \cdot X + B$
 - Wenn $X_i < 3 \text{ OD Einheiten}$, dann X berechnet = X_i
 - Wenn $X_i > 3 \text{ OD Einheiten}$, dann X berechnet = $(Y_i - B)/A$

- Die Kalibrationskurve wird unter Verwendung einer 4 Parameter logistischen Kurve erstellt.
- Die IL-6-Konzentration in den Proben wird durch Interpolation auf der Kalibrationskurve bestimmt.

B. Bichromatische Auswertung

- Werten Sie die Platte bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) aus.
- Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
- Tragen Sie die OD-Werte (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende IL-6 Konzentration (Abszisse) auf und zeichnen Sie eine Kalibrationskurve durch die Kalibrationspunkte.
- Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Kalibrationskurve.
- Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer "4 Parameter"-Kurvenfunktion.

XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und sollten nicht als Ersatz für die Echtzeitstandardkurve verwendet werden.

IL-6-ELISA		OD-Einheiten Polychromatisches Modell	
Kalibrator		0 pg/ml	79
		23,3 pg/ml	125
		68 pg/ml	193
		201 pg/ml	408
		633 pg/ml	1036
		2560 pg/ml	3579

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen. Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswert bei Nullbindung, entsprach 2 pg/ml.

B. Spezifität

Es wurde keine signifikante Kreuzreaktion beobachtet beim Vorhandensein von 50 ng IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN-α, IFN-γ, LIF, MIP-1α, MIP-1β, MCP-1, OSM, RANTES, TGF-β, TNF-α und TNF-β beobachtet. Eine sehr schwache Kreuzreaktion (0,06 %) wurde mit G-CSF beobachtet.

Interferenz mit den löslichen Rezeptoren (sIL6R und SGP-130)

Keine signifikante Kreuzreaktion wurde in Gegenwart von 100 ng sIL6 Rezeptor und SGP-130 beobachtet.

IL-6 Konz (pg/ml)	IL-6 gemessen mit 100 ng/ml sIL6R (pg/ml)	IL-6 gemessen mit 100 ng/ml SGP-130 (pg/ml)
7,5	4,3	8,3
74,0	81,8	76,0
678,0	734,0	671,0

Es wurde keine Interferenz festgestellt.

C. Präzision

INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
Serum	N	$\text{\bar{X}} \pm \text{SD}$ (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	$\text{\bar{X}} \pm \text{SD}$ (pg/ml)	CV (%)
A	20	$147 \pm 6,1$	4,2	A	20	114 ± 5	4,4
B	20	623 ± 27	4,3	B	20	270 ± 15	5,4

SD: Standardabweichung, CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST

Probe	Zugegebenes IL-6 (pg/ml)	Wiedergefunden IL-6 (pg/ml)	Wiedergefunden (%)
Serum 1	1066 547 228	1035 541 234	97,1 98,9 102,6
Serum 2	1066 547 228	1110 531 250	104,1 97,1 109,6

VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünnung	Theoretische Konz. (pg/ml)	Gemessene Konz. (pg/ml)
Serum	1/1	-	966
	1/2	483	478
	1/4	241,5	247
	1/8	120,8	130
	1/16	60,4	54
	1/32	30	23

Die Proben wurden mit Probenverdünner verdünnt.

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im Folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann gewährleistet ist, wenn die Probe 30 Minuten nach Zugabe der Kalibratoren in die beschichteten Wells zugegeben wird.

Zeitdifferenz

Probe	0 Min	10 Min	20 Min	30 Min	40 Min
1	61	53	56	61	76
2	196	179	205	213	273
3	1584	1478	1433	1418	1533

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ergebnisse für Kontrolle 1 und/oder Kontrolle 2 nicht den auf den Fläschchen angegebenen Sollwertbereichen, können die Ergebnisse nicht ohne treffende Erklärung der Abweichungen verwendet werden.
- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seine eigenen Pools herstellen, die in Aliquoten eingefroren werden sollten. Azidhaltige Kontrollen stören die Enzymreaktion und können nicht verwendet werden.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten einer Doppelbestimmung von Proben sollten auf Guter Laborpraxis beruhen.
- Es wird empfohlen, Kontrollen im Assay routinemäßig wie unbekannte Proben zu behandeln, um die Assayvarianz zu messen. Die Leistung des Assays sollte mit Qualitätskontrollkarten der Kontrollen überprüft werden.
- Es hat sich bewährt, die durch den Computer ausgewählte Kurvenanpassung visuell zu überprüfen.

XV. REFERENZINTERVALLE

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

Als allgemeiner Richtwert lagen die Ergebnisse von 34 Serumproben gesunder Personen mit niedrigem CRP-Spiegel zwischen 0 und 50 pg/ml. 31 Proben ergaben Werte unter 17 pg/ml.

XVI. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit in Europa und/oder FDA-anerkannten Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit darüber liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren

gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde.

Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiös betrachtet werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit allen Reagenzien; Stopflösung enthält HCl, Bei Kontakt gründlich mit Wasser spülen.

Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und verwenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

Weitere Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (MSDS).

XVII. LITERATUR

1. Houssiau FA et al., (1988)
IL-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides.
Arth. Rheum., 31:784-788.
2. Houssiau FA et al., (1994)
Plasma cytokine determination in emergency department patients as predictor of bacteremia and infectious disease severity.
Critical care Medicine, 22:1102-1107.
3. SAKAMOTO K. et al., (1994)
Elevation of circulating interleukin 6 after surgery : factors influencing the serum level.
Cytokine, 6:181-186.
4. KITA Y. et al., (1994)
Evaluation of sequential serum interleukin-6 levels in liver allograft recipients.
Transplantation, 57:1037-1041.
5. LE MOINE O. et al., (1994)
Interleukin-6: an early marker of bacterial infection in decompensated cirrhosis.
J. of Hepatology, 20:819-824.

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	KALIBRATOREN (μ l)	PROBE(N) KONTROLLEN (μ l)
Inkubationspuffer Kalibratoren (0-5) Proben, Kontrollen	50 100 -	50 - 100
1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren. Inhalt jedes Well absaugen. Dreimal mit 400 μ l Waschlösung waschen und absaugen.		
Anti-IL-6-HRP-Konjugat Probenverdünner	100 50	100 50
1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren. Inhalt jedes Well absaugen. Dreimal mit 400 μ l Waschlösung waschen und absaugen.		
Chromogene Lösung	200	200
15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren.		
Stopplösung	100	100
Auf einem Mikrotiterplatten-Lesegerät auswerten und Absorption jedes Well bei 450 nm (und 490 nm) gg. 630 nm (oder 650 nm) vermerken.		

Der Instrumentierungsservice von Diasource bietet Ihnen die Möglichkeit, ein für dieses Kit angepasstes Protokoll für die Verwendung auf der Stratec Gemini 2PS + Combo-Plattform zu erwerben, einschließlich Protokoll-Assay-Datei, Reagenzien-Datei und Tipps für die ordnungsgemäße Verwendung des Kits auf dem Instrument.

Wenn Sie weitere Informationen benötigen, wenden Sie sich bitte an IVDInstrumentation@diasource.be



it

Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

IL-6-ELISA

I. USO DEL KIT

Kit immunoenzimetrico per la determinazione quantitativa in vitro dell'interleuchina -6 (IL-6) in siero.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale: DIAsource IL-6-ELISA Kit
- B. Numero di catalogo: KAP1261 : 96 tests
- C. Prodotto da: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:
Tel: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche

L'interleuchina 6 (IL-6) umana è un polipeptide di 184 aa che presenta siti di potenziale O- e N- glicosilazione e significativa omologia con il G-CSF. Viene prodotta da vari tipi di cellule tra cui linfociti T e B, monociti, fibroblasti, cheratinociti, cellule endoteliali, cellule mesangiali, astrociti, cellule stromali del midollo osseo e varie cellule tumorali. Regola la crescita e la differenziazione di vari tipi di cellule che rivestono un ruolo chiave nel sistema immunitario ed emopoietico e nella risposta infiammatoria. Tali molteplici effetti sono integrati in un complesso network citochinico nell'ambito del quale diverse citochine inducono la IL-6 (IL-1, TNF, PDGF, IFNs,...) o vengono indotte dalla IL-6, con effetti finali derivanti da attività sinergiche o antagonistiche tra IL6 e altre citochine (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5,IFN γ , IL-3, GM-CSF, M-CSF,CSF,...). La IL-6 induce la maturazione finale dei linfociti B in cellule produttrici di anticorpi ed è un potente fattore di crescita e di differenziazione delle cellule del mieloma/plasmocitoma. Essa (co-)stimola la crescita dei linfociti T e la differenziazione in linfociti T citotossici. Promuove lo sviluppo dei megacariociti e, per effetto sinergico con altre citochine, stimola la proliferazione dei precursori multipotenti ematopoietici. Può inoltre indurre la differenziazione e l'inibizione della crescita di alcune linee cellulari tumorali leucemiche o non ematopoietiche. La IL-6 è altresì un importante induttore delle reazioni della fase acuta in risposta all'infiammazione o a un danno tissutale. Unitamente all'IL-1 e al TNF, induce la sintesi delle proteine della fase acuta (APP) da parte degli hepatociti, con ciascuna citochina o combinazione di citochine caratterizzate da un preferenziale pattern produttivo di APP. La IL-6 interagisce con il sistema neuroendocrino, inducendo ad esempio la produzione di ACTH. Pertanto, la IL-6 è una citochina pleiotropica capace di svolgere molteplici attività endocrine, paracrine e probabilmente\ autocrine in diversi tessuti.

B. Applicazione clinica

Mentre nella maggior parte dei soggetti normali di controllo i livelli sierici di IL-6 sono indeterminabili, nei soggetti che presentano gravi condizioni infiammatorie quali una setticemia sono rilevabili ingenti quantità di IL-6. L'incremento dei livelli sieri di IL-6 precede quello delle proteine della fase acuta, es. nella fase post-operatoria, e può essere pertanto considerato un parametro sensibile e precoce, utile alla valutazione di uno stato infiammatorio.

La presenza di IL-6 nel siero è stata già descritta in associazione a danno tissutale chirurgico o traumatico, malattie infettive o autoimmuni come l'artrite, rigetto di trapianto, cirrosi epatica alcolica, neoplasie maligne ecc.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

DIAsource IL-6-ELISA è un immunoassay a sensibilità amplificata a fase solida eseguito su piastre di microtitolazione. Il dosaggio utilizza anticorpi monoclonali (Mabs) diretti contro epitopi distinti dell'IL-6. I calibratori e i campioni reagiscono con la cattura dell'anticorpo monoclonale (MAb 1) che riveste il pozzetto di microtitolazione e con un anticorpo monoclonale (MAb 2) marcato con horseradish perossidasi (HRP). Dopo un periodo di incubazione che consente la formazione di un sandwich: MAb 1 di rivestimento -IL-6 umana - MAb 2 - HRP, la piastra di microtitolazione viene lavata per rimuovere l'anticorpo marcato con enzima non legato. L'anticorpo marcato con enzima non legato viene misurato attraverso una reazione cromogenica. Si procede quindi con l'aggiunta della soluzione cromogena (TMB) e successiva incubazione. La reazione viene interrotta con l'aggiunta di Soluzione di arresto; quindi la piastra di microtitolazione viene letta alla lunghezza d'onda adeguata. La quantità di turnover del substrato viene determinata colorimetricamente misurando l'assorbanza che è proporzionale alla concentrazione di IL-6.

Viene tracciata una curva di calibrazione e la concentrazione IL-6 nei campioni viene determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione. L'utilizzo del lettore ELISA (linearità fino a 3 unità OD) associato all'impiego di un sofisticato metodo di riduzione dati (riduzione dati policromatica) garantisce un'elevata sensibilità nel range basso dei valori e un esteso range di calibrazione.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione
LU Piastra di microtitolazione con 96 pozzetti , rivestiti anti IL-6 (anticorpi monoclonali)	96 pozzetti	Blu	Pronta per l'uso
Ab HRP Coniugato: anti-IL-6 (anticorpi monoclonali) marcato con HRP in tampone borato con albumina di siero bovino e timolo	1 flacone 11 ml	Rosso	Pronta per l'uso
CAL N Calibratore N= 0-5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in plasma umano con albumina di siero bovino, benzamidina e timolo	6 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
DIL SPE Diluente del Campione: plasma umano con albumina di siero bovino, benzamidina e timolo.	2 flaconi liofiliz.	nero	Aggiungere acqua distillata (vedi etichetta per volumi esatti)
INC BUF Tampone di Incubazione: Tampone borato con albumina di siero bovino, benzamidina e timolo.	1 flacone 11 ml	nero	Pronta per l'uso
WASH SOLN CONC Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	1 flacone 10 ml	Bruno	Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico)..
CONTROL N Controlli: N = 1 o 2, (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi) in plasma umano con timolo	2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
CHROM TMB Soluzione Cromogena TMB	1 flacone 25 ml	Bianco	Pronta per l'uso

STOP	SOLN	1 flacone 12 ml	Bianco	Pronto per l'uso
Soluzione di arresto: HCl 2N				

Note: 1. Usare Diluente del Campione per diluire i campioni.
2. 1 pg della preparazione standard è equivalente a 100 mIU dell'NIBSC 1st IS 89/548.

VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

1. Acqua distillata di qualità elevata
2. Pipette per dispensare 50 µl, 100 µl 200 µl, 1 ml e 10 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Agitatore tipo vortex.
4. Agitatore magnetico.
5. Agitatore orizzontale per micropiastre da 700 ± 100 rpm.
6. lavatrice per piastra di microtitolazione
7. Lettore di micropiastre per lettura a 450, 490 e 650 nm (in caso di lettura policromatica) o per lettura a 450 e 650 nm (in caso di lettura bicromatica).
8. Strumentazione aggiuntiva: l' ELISA-AID™ necessario per la lettura policromatica delle piastre (vedi paragrafo XI.A) è acquistabile presso Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- Calibratore:** Ricostituire i calibratori con 1 ml di acqua distillata.
- Controlli:** Ricostituire i controlli con 1 ml di acqua distillata.
- Diluente del Campione:** Ricostituire il Diluente del Campione aggiungendo acqua distillata fino al volume riportato sull'etichetta del flacone.
- Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 199 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (200x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Le strisce reattive inutilizzate devono essere conservate a 2-8°C, in un contenitore sigillato che contenga un essiccatore fino alla data di scadenza.
- Dopo la ricostituzione, i calibratori, i controlli e il Diluente del Campione sono stabili 4 giorni a 2-8°C. Per periodi di conservazione molto lunghi, preparare e mantenere le aliquote a -20°C per un massimo di 2 mesi.. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento dei campioni.
- La soluzione di lavaggio concentrata è stabile a temperatura ambiente (18-25°C) fino alla data di scadenza.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il coniugato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- A coagulazione e centrifugazione avvenute, il siero dovrà essere rimosso al più presto dal coagulo di eritrociti e conservato a 4°C. In caso di utilizzo non immediato, i campioni dovranno essere conservati a -70°C per un anno al massimo.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento dei campioni.
- Prima dell'impiego, tutti i campioni devono essere a temperatura ambiente (18-25°C). Si raccomanda di vortexare i campioni prima di utilizzarli.
- Le condizioni di raccolta possono influenzare i valori. Adottare pertanto le massime precauzioni durante la raccolta per evitare che eventuali impurità contenute nei campioni possano stimolare la produzione di IL-6 da parte delle cellule ematiche con conseguente aumento falso dei livelli sierici di IL-6.
- Le provette di raccolta devono essere apicolte.

X. METODO DEL DOSAGGIO

A. Avvertenze generali

Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza.

.

Non mescolare reattivi di lotti diversi.

Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente (18-25°C).

Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione.

Eseguire calibratori, controlli e campioni in doppio. Si raccomanda l'allineamento verticale.

Utilizzare un contenitore di plastica pulito per preparare la soluzione di lavaggio.

Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.

Per la distribuzione della soluzione cromogena e la Soluzione di arresto evitare pipette con parti metalliche.

L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio.

Rispettare i tempi di incubazione.

Per evitare derive, l'intervallo tra il pipettaggio del primo calibratore e l'ultimo campione deve essere limitato ai tempi riportati nella sezione XIII, paragrafo E (Tempo Trascorso).

Allestire una curva di calibrazione per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di calibrazione di sedute analitiche precedenti.

Distribuzione della soluzione cromogena entro 15 minuti dopo il lavaggio della piastra di microtitolazione.

Durante l'incubazione con la soluzione cromogena evitare la luce diretta del sole sulla piastra di microtitolazione.

Ogni pozzetto può essere utilizzato solo una volta.

B. Metodo del dosaggio

1. Selezionare il numero di strisce reagenti necessario per il test. Le strisce reagenti inutilizzate devono essere risigillate nel contenitore con un essiccante e conservate a 2-8°C.
2. Assicurare le strisce reagenti nel telaio di supporto.
3. Pipettare 50 µl di Tamponi di Incubazione in ogni pozzetto.
4. Pipettare 100 µl di ogni calibratore, controllo e campione nei pozzetti adeguati.
5. Incubare per 1 ora a temperatura ambiente (18-25°C) su un agitatore orizzontale a 700 ± 100 rpm.
6. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
7. Lavare la piastra 3 volte :
 - versando 0,4 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
 - aspirando il contenuto di ogni pozzetto
8. Pipettare 100 µl di coniugato anti-IL-6-HRP e 50 µl di diluente del campione in tutti i pozzetti.
9. Incubare per 1 ora a temperatura ambiente (18-25°C) su un agitatore orizzontale a 700 ± 100 rpm.
10. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
11. Lavare la piastra 3 volte :
 - versando 0,4 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
 - aspirando il contenuto di ogni pozzetto
12. Pipettare in ogni pozzetto 200 µl di Soluzione Cromogena entro 15 minuti dal termine della fase di lavaggio.
13. Incubare la piastra di microtitolazione per 15 minuti a temperatura ambiente (18-25°C) su un agitatore orizzontale a 700 ± 100 rpm ; evitare la luce diretta del sole.
14. Pipettare 100 µl di soluzione di arresto in ogni pozzetto.
15. Leggere le assorbance a 450 nm a 490 nm (filtro di riferimento a 630 nm o 650 nm) entro 3 ore e calcolare i risultati come descritto nella sezione XI.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

A. Lettura policromatica:

1. In questo caso, l'elaborazione dati verrà effettuata dal software ELISA-AID™.
2. La piastra viene letta a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
3. Verrà quindi effettuata una seconda lettura a 490 nm rispetto allo stesso filtro di riferimento.
4. Il Software ELISA-AID™ guiderà automaticamente il lettore e integrerà le due letture utilizzando un modello policromatico. Tale tecnica può generare valori fino a 10 OD.
5. Il principio dell'elaborazione policromatica dei dati è la seguente:
 - $X_i = OD$ a 450 nm
 - $Y_i = OD$ a 490 nm
 - Utilizzando una regressione lineare standard non pesata, i parametri A & B sono calcolati: $Y = A \cdot X + B$
 - Se $X_i < 3$ unità OD, X calcolato = X_i
 - Se $X_i > 3$ unità OD, X calcolato = $(Y_i - B)/A$
 - Per tracciare la curva di calibrazione viene utilizzato un modello di adattamento della curva logistica a 4 parametri.
 - La concentrazione di IL-6 nel campione viene determinata per interpolazione sulla curva di calibrazione.

B. Lettura bicromatica

1. Leggere la piastra a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).

2. Calcolare la media delle determinazioni in doppio.
3. Costruire la curva di calibrazione ponendo lineare in ordinata le medie dei OD dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di IL-6.
4. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
5. È possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I dati qui di seguito riportati sono esclusivamente indicativi e non dovranno assolutamente essere utilizzati in sostituzione della curva di calibrazione tracciata in tempo reale.

IL-6-ELISA		Unità OD Modello policromatico
Calibratore	0 pg/ml 23,3 pg/ml 68 pg/ml 201 pg/ml 633 pg/ml 2560 pg/ml	79 125 193 408 1036 3579

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Venti replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard. La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con OD pari alla media più 2 deviazioni standard di 20 replicati dello standard zero, è risultata essere 2 pg/ml.

B. Specificità

Nessuna reazione crociata significativa è stata osservata in presenza di 50 ng di IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN-α, IFN-γ, LIF, MIP-1α, MIP-1β, MCP-1, OSM, RANTES, TGF-β, TNF-α and TNF-β. Una reattività crociata molto lieve (0,06%) è stata osservata con il G-CSF.

Interferenza con i Recettori solubili (sIL6R e sgp-130)

Nessuna reazione crociata significativa è stata osservata in presenza di 100 ng di Recettore sIL6 e sgp-130.

conc. di IL-6 (pg/ml)	IL-6 misurata con 100 ng/ml di sIL6R (pg/ml)	IL-6 misurata con 100 ng/ml di sgp-130 (pg/ml)
7,5	4,3	8,3
74,0	81,8	76,0
678,0	734,0	671,0

Non è stata osservata alcuna interferenza.

C. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	$\bar{X} \pm SD$ (pg/ml)	CV (%)	Siero	N	$\bar{X} \pm SD$ (pg/ml)	CV (%)
A	20	147 ± 6,1	4,2	A	20	114 ± 5	4,4
B	20	623 ± 27	4,3	B	20	270 ± 15	5,4

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI RECUPERO

Campione	IL-6 aggiunta (pg/ml)	IL-6 recuperata (pg/ml)	Recupero (%)
Siero 1	1066 547 228	1035 541 234	97,1 98,9 102,6
Siero 2	1066 547 228	1110 531 250	104,1 97,1 109,6

TEST DI DILUIZIONE

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (pg/ml)	Concentrazione misurata (pg/ml)
Siero	1/1	-	966
	1/2	483	478
	1/4	241,5	247
	1/8	120,8	130
	1/16	60,4	54
	1/32	30	23

I campioni sono stati diluiti con Diluente del Campione.

E. Tempo trascorso tra l'aggiunta dell'ultimo calibratore e il campione

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 30 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO

campione	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min
1	61	53	56	61	76
2	196	179	205	213	273
3	1584	1478	1433	1418	1533

XIV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. I controlli che contengono azide interferiscono con la reazione enzimatica e quindi non possono essere utilizzati.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.
- Si raccomanda di saggiare i controlli con regolarità come campioni sconosciuti per misurare la variabilità del saggio. La resa del saggio deve essere monitorata con tabelle di controllo qualità dei controlli.
- È buona pratica verificare visivamente il modello di curva selezionato dal computer.

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori vengono dati solo come guida; ogni laboratorio deve stabilire i propri intervalli normali di valori.

Come riferimento, i risultati di 34 campioni di siero appartenenti a soggetti apparentemente sani con bassi livelli di PCR, hanno mostrato valori interni al range 0 – 50 pg/ml. In 31 campioni, si sono ottenuti valori inferiori a 17 pg/ml.

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.

Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare qualsiasi contatto della cute con tutti i reagenti, la soluzione di Arresto contiene HCl. In caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua.

Non fumare, bere, mangiare o applicare cosmetici nell'area di lavoro. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Utilizzare indumenti protettivi e guanti monouso.

Per ulteriori informazioni, consultare la scheda di sicurezza (MSDS).

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- HOUSSIAU F.A. et al., (1988) **IL-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides.** Arth. Rheum., 31:784-788.
- MOSCOVITZ H. et al., (1994) **Plasma cytokine determination in emergency department patients as predictor of bacteremia and infectious disease severity.** Critical care Medicine, 22:1102-1107.
- SAKAMOTO K. et al., (1994) **Elevation of circulating interleukin 6 after surgery : factors influencing the serum level.** Cytokine, 6:181-186.
- KITA Y. et al., (1994) **Evaluation of sequential serum interleukin-6 levels in liver allograft recipients.** Transplantation, 57:1037-1041.
- LE MOINE O. et al., (1994) **Interleukin-6 : an early marker of bacterial infection in decompensated cirrhosis.** J. of Hepatology, 20:819-824.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

CALIBRATORE (μl)	CAMPIONI CONTROLLI (μl)
Tampone di Incubazione	50
Calibratore (0 - 5)	100
Campioni, controlli	-
Incubare per 1 ora a temperatura ambiente (18-25°C) in agitazione continua a 700 rpm. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 400 μl di soluzione di lavaggio e aspirare.	50 100 100
Coniugato anti-IL-6-HRP Diluente del Campione	100 50
Incubare per 1 ora a temperatura ambiente (18-25°C) in agitazione continua a 700 rpm. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 400 μl di soluzione di lavaggio e aspirare.	100 50
Soluzione chromogena	200
Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (18-25°C) in agitazione continua a 700 rpm.	200
Soluzione di arresto	100
Leggere su un lettore per piastra da microtitolazione e registrare l'assorbanza di ogni pozzetto a 450 nm (e 490 nm) rispetto a 630 (o 650 nm)	100

Il servizio di strumentazione di Diasource può offrirti la possibilità di acquisire un protocollo adattato per questo kit da utilizzare sulla piattaforma Stratec Gemini 2PS + Combo che include il file di test del protocollo, il file di reagente e suggerimenti per il buon uso del kit sullo strumento.

Se hai bisogno di ulteriori informazioni, contatta IVDInstrumentation@diasource.be

Lea todo el protocolo antes de usar.

IL-6-ELISA

I. INDICACIONES

Ensayo inmunoenzimétrico para la determinación cuantitativa in vitro de interleucina-6 (IL-6) humana en suero.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre comercial: Kit DIAsource IL-6-ELISA
- B. Número de catálogo: KAP1261: 96 pruebas
- C. Fabricado por: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para recibir asistencia técnica o información sobre pedidos contacte con:

Tel: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. ANTECEDENTES CLÍNICOS

A. Actividades biológicas

La interleucina 6 (IL-6) humana es un polipéptido de 184 aminoácidos con potenciales sitios de O y N-glicosilación, y una considerable homología con el G-CSF. La producen varias células, incluidas las células T y B, monocitos, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, células mesangiales, astrocitos, células estromales de la médula ósea y células tumorales. Regula la proliferación y la diferenciación de varios tipos de células con actividades importantes en el sistema inmune, la hematopoyesis y la inflamación. Estas múltiples acciones están integradas dentro de una compleja red de citocinas, donde varias citocinas inducen (IL-1, TNF, PDGF, IFN, ...) o son inducidas por la IL-6 y los efectos finales son el resultado de actividades o sinérgicas o antagonistas entre la IL-6 y las otras citocinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IFN γ , IL-3, GM-CSF, M-CSF, CSF, ...). La IL-6 induce la maduración final de células B en células productoras de anticuerpos y es un potente factor de crecimiento de células de mieloma/plasmacitoma. (Co-) estimula la proliferación de células T y la diferenciación de células T citotóxicas. Promueve el desarrollo de megacariocitos y se sinergiza con otras citocinas para estimular progenitores hematopoyéticos pluripotentes. También puede inducir la diferenciación y la inhibición de la proliferación de algunas líneas de células tumorales no hematopoyéticas o de leucemia. La IL-6 es además un inductor importante de las reacciones de fase aguda en respuesta a la inflamación o a una lesión tisular. Junto con la IL-1 y el TNF, induce la síntesis de proteínas de fase aguda (APP) por los hepatocitos, mostrando cada citocina o combinación de citocinas un patrón preferente en la producción de APP. IL-6 interactúa asimismo con el sistema neuroendocrino, por ejemplo, induciendo la producción de ACTH. De modo que la IL-6 es una citocina pleiotrópica con múltiples actividades endocrinas, paracrinias y posiblemente autocrinas en diversos tejidos.

B. Aplicación clínica

Aunque la mayoría de los controles normales tienen niveles indetectables de IL-6 en su suero, se detectan grandes cantidades de IL-6 en situaciones de inflamación grave como la septicemia. La elevación de la IL-6 sérica precede a la de proteínas de fase aguda, por ej. en un fenómeno posoperatorio, y puede por tanto ser un parámetro sensible temprano para investigar afecciones inflamatorias.

La IL-6 sérica ya se ha descrito asociada a lesiones tisulares quirúrgicas o traumáticas, enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes incluida la artritis, rechazo a injertos, cirrosis hepática alcohólica, neoplasias malignas, etc.

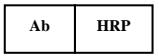
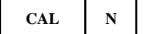
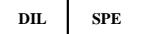
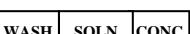
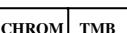
IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El DIAsource IL-6-ELISA es un inmunoensayo enzimático de sensibilidad amplificada en fase sólida que se realiza en placa de microvaloración. El ensayo utiliza anticuerpos monoclonales (AcM) dirigidos contra distintos epítopos de la IL-6. Los calibradores y las muestras reaccionan con el anticuerpo monoclonal de captura (AcM 1) que recubre el pocillo de microvaloración y con un anticuerpo monoclonal (AcM 2) marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Tras un período de incubación que permite la formación de un sándwich:

AcM 1 recubierto — IL-6 humana — AcM 2 — HRP, se lava la placa de microvaloración para eliminar el anticuerpo marcado con enzimas no unidas. El anticuerpo marcado con enzimas unidas se mide a través de una reacción cromogénica. Se añade la solución cromogénica (TMB) y se incuba. Se detiene la reacción añadiendo solución de parada y a continuación se lee la placa de microvaloración a la longitud de onda adecuada. La cantidad de sustrato transformado se determina colorimétricamente midiendo la absorbancia, que es proporcional a la concentración de IL-6.

Se representa una curva de calibración y se determina la concentración de IL-6 de las muestras mediante interpolación en la curva de calibración. El uso del lector de ELISA (linealidad hasta 3 unidades de DO) y de un método sofisticado de reducción de datos (reducción de datos policromáticos) da lugar a una sensibilidad alta en el intervalo bajo y a un intervalo de calibración extendido.

V. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Reactivos	Kit de 96 pruebas	Código de color	Reconstitución
 Placa de microvaloración de 96 pocillos recubiertos con anti-IL-6	96 pocillos	azul	Lista para usar
 Conjuguado: anti-IL-6 (anticuerpos monoclonales) marcada con HRP en tampón de borato con albúmina de suero bovino y timol	1 vial 11 ml	rojo	Listo para usar
 Calibrador N = 0 a 5 (véanse los valores exactos en las etiquetas del vial) en plasma humano con albúmina de suero bovino, benzamidina y timol	6 viales liofil.	amarillo	Añadir 1 ml de agua destilada
 Diluyente de muestras: plasma humano con albúmina de suero bovino, benzamidina y timol	2 viales liofil.	negro	Añadir agua destilada (véase en la etiqueta el volumen exacto)
 Tampón de incubación: tampón de borato con albúmina de suero bovino, benzamidina y timol	1 vial 11 ml	negro	Listo para usar
 Solución de lavado (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 200 x con agua destilada (usar un agitador magnético)
 Controles - N = 1 o 2 (véanse los valores exactos en las etiquetas del vial) en plasma humano con timol	2 viales liofil.	plata	Añadir 1 ml de agua destilada
 Solución de TMB cromogénica	1 vial 25 ml	blanco	Lista para usar

STOP	SOLN	1 vial 12 ml	blanco	Lista para usar
Solución de parada: HCl 2N				

- Nota:**
1. Usar el diluyente de muestras para las diluciones.
 2. 1 pg de la preparación del calibrador es equivalente a 100 mIU del 1^{er} estándar internacional 89/548 del NIBSC.

VI. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

El material siguiente es necesario, pero no se proporciona en el kit:

1. Agua destilada de alta calidad
2. Pipetas para dispensación de: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml y 10 ml (se recomienda usar pipetas de precisión con puntas de plástico desechables)
3. Agitador vórtex
4. Agitador magnético
5. Agitador de placas de microvaloración con capacidad de 700 rpm ± 100 rpm
6. Lavador de placas de microvaloración
7. Lector de placas de microvaloración con capacidad para leer a 450, 490 y 650 nm (en el caso de lectura policromática) o con capacidad para 450 y 650 nm (lectura bicromática)
8. Equipo opcional: El software ELISA-AID™ que hace falta para leer la placa según la lectura policromática (véase el párrafo XLA.) se puede adquirir en Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 EE UU.

VII. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- Calibradores:** reconstituya los calibradores con 1 ml de agua destilada.
- Controles:** reconstituya los controles con 1 ml de agua destilada.
- Diluyente de muestras:** reconstituya el diluyente de muestras al volumen especificado en la etiqueta del vial con agua destilada.
- Solución de lavado de trabajo:** prepare un volumen adecuado de solución de lavado de trabajo añadiendo 199 volúmenes de agua destilada a 1 volumen de solución de lavado (200 x). Use un agitador magnético para homogeneizar. Deseche la solución de lavado de trabajo no utilizada al final de la jornada.

VIII. CONSERVACIÓN Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir o de la reconstitución, todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad, indicada en la etiqueta del vial, si se conservan entre 2 y 8 °C.
- Las tiras sin usar deben conservarse entre 2 y 8 °C en una bolsa sellada que contenga desecante hasta la fecha de caducidad.
- Tras la reconstitución, los calibradores, los controles y el diluyente de muestras se mantienen estables durante 4 días a 2-8 °C. Para períodos de tiempo más largos, deben tomarse partes alícuotas y conservarse a -20 °C durante un máximo de 2 meses. Evite ciclos posteriores de congelación y descongelación.
- La solución de lavado concentrada es estable a temperatura ambiente (18-25°C) hasta la fecha de caducidad.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada deberá utilizarse en el mismo día.
- Despues del primer uso, el conjugado se mantiene estable hasta la fecha de caducidad si se conserva en el vial original bien cerrado entre 2 y 8 °C.
- Las alteraciones del aspecto físico de los reactivos del kit pueden indicar inestabilidad o deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- El suero debe eliminarse lo antes posible del coágulo de hematíes tras la coagulación y centrifugación, y conservarse a 4°C. Si las muestras no se utilizan inmediatamente, deben conservarse a -20 °C durante un máximo de 2 meses, y a -70 °C para períodos más largos (máximo un año).
- Evite ciclos posteriores de congelación y descongelación.
- Todas las muestras deben estar a temperatura ambiente (18-25°C) antes de usar. Se recomienda agitar las muestras en un vórtex antes de usar.
- Las condiciones de obtención de las muestras pueden influir en los valores; por tanto, deben tomarse estrictas precauciones durante su recogida para evitar impurezas contenidas en los materiales de obtención de las muestras que estimulen la producción de IL-6 por las células sanguíneas y aumentar así incorrectamente los valores de IL-6 en suero.
- Los tubos de recogida deben ser apirógenos.

X. PROCEDIMIENTO

A. Notas sobre la manipulación

- No utilice el kit o sus componentes pasada la fecha de caducidad.
No mezcle materiales de distintos lotes de kit.
Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (18-25°C) antes de usar.
Mezcle bien todos los reactivos y muestras agitándolos o revolviéndolos suavemente.
Realice los calibradores, los controles y las muestras por duplicado. Se recomienda alinear verticalmente.
Utilice un recipiente de plástico limpio para preparar la solución de lavado.
Para prevenir que se produzca contaminación cruzada, utilice una punta de pipeta desechable al añadir cada reactivo y muestra.
No utilice pipetas con partes metálicas para dispensar la solución cromogénica y la solución de parada.
Las pipetas de alta precisión o un equipo de pipeteo automatizado mejorarán la precisión.
Respete los tiempos de incubación.
Para que no haya desvíos, el tiempo entre el pipeteo del primer calibrador y la última muestra debe limitarse al tiempo indicado en el apartado XIII, párrafo E (Tiempo de demora).
Prepare una curva de calibración para cada análisis, no utilice datos de análisis anteriores.
Dispense la solución cromogénica antes de transcurridos 15 minutos desde el lavado de la placa de microvaloración.
Durante la incubación con solución cromogénica, evite la luz solar directa en la placa de microvaloración.
Cada pozo solo se puede usar una vez.

B. Procedimiento

- Seleccione el número necesario de tiras para el análisis. Las tiras no utilizadas deberían volverse a guardar herméticamente en la bolsa con un desecante y conservarse entre 2 y 8 °C.
- Fije las tiras en el marco de soporte.
- Pipete 50 µl de tampón de incubación en todos los pocillos.
- Pipete 100 µl de cada calibrador, control y muestra en los pocillos adecuados.
- Incube durante 1 hora a temperatura ambiente (18-25°C) en un agitador horizontal configurado a 700 ± 100 rpm.
- Aspire el líquido de cada pocillo.
- Lave la placa 3 veces:
 - Dispensando 0,4 ml de solución de lavado en cada pocillo
 - Aspirando el contenido de cada pocillo
- Pipete 100 µl de conjugado anti-IL-6-HRP y 50 µl de diluyente de muestras en todos los pocillos.
- Incube durante 1 hora a temperatura ambiente (18-25°C) en un agitador horizontal configurado a 700 ± 100 rpm.
- Aspire el líquido de cada pocillo.
- Lave la placa 3 veces:
 - Dispensando 0,4 ml de solución de lavado en cada pocillo
 - Aspirando el contenido de cada pocillo
- Pipete 200 µl de la solución cromogénica en cada pocillo en los 15 minutos siguientes al paso de lavado.
- Incube la placa de microvaloración durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) en un agitador horizontal configurado a 700 ± 100 rpm y evite la luz solar directa.
- Pipete 100 µl de solución de parada en cada pocillo.
- Lea las absorbancias a 450 y 490 nm (filtro de referencia a 630 o 650 nm) antes de 3 horas y calcule los resultados conforme se describe en el apartado XI.

XI. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

A. Lectura policromática

- En este caso, el software ELISA-AID™ realizará el procesamiento de los datos.
- La placa se lee primero a 450 nm con respecto a un filtro de referencia configurado a 650 nm (o 630 nm).
- Se realiza una segunda lectura a 490 nm con respecto al mismo filtro de referencia.
- El software ELISA-AID™ controlará el lector automáticamente e integrará ambas lecturas en un modelo policromático. Esta técnica puede generar densidades ópticas (DO) de hasta 10.
- El principio del procesamiento de datos policromáticos es el siguiente:
 - $Xi = DO \text{ a } 450 \text{ nm}$
 - $Yi = DO \text{ a } 490 \text{ nm}$

- Utilizando una regresión lineal no ponderada estándar, se calculan los parámetros A y B: $Y = A*X + B$
- Si $Xi < 3$ unidades de DO, entonces la X calculada = Xi
- Si $Xi > 3$ unidades de DO, entonces la X calculada = $(Yi - B)/A$
- Se emplea un ajuste de la curva logística de 4 parámetros para generar la curva de calibración.
- La concentración de IL-6 de las muestras se determina mediante interpolación en la curva de calibración.

B. Lectura bicromática

- Lea la placa a 450 nm con respecto a un filtro de referencia configurado a 650 nm (o 630 nm).
- Calcule la media de las determinaciones por duplicado.
- Represente los valores de DO (en las ordenadas) de cada calibrador en función de la concentración correspondiente de IL-6 (abscisas) y trace una curva de calibración por los puntos de los calibradores.
- Lea la concentración de cada control y muestra mediante interpolación en la curva de calibración.
- La reducción de datos con programas informáticos simplificará estos cálculos. Si se emplea un procesamiento automático de los resultados, se recomienda un ajuste de la curva mediante función logística de 4 parámetros.

XII. DATOS TÍPICOS

Los datos siguientes son solo a efectos ilustrativos y no deben utilizarse nunca en lugar de la curva de calibración generada en tiempo real.

IL-6-ELISA		Unidades de DO Modelo policromático
Calibrador	0 pg/ml 23,3 pg/ml 68 pg/ml 201 pg/ml 633 pg/ml 2560 pg/ml	79 125 193 408 1036 3579

XIII. EFICACIA Y LIMITACIONES

A. Límite de detección

Se analizaron veinte calibradores cero junto con un conjunto de otros calibradores. El límite de detección, definido como la concentración aparente dos desviaciones estándar por encima del promedio de DO en la unión cero, fue de 2 pg/ml.

B. Especificidad

No se observó ninguna reacción cruzada significativa en presencia de 50 ng de IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN-α, IFN-γ, LIF, MIP-1α, MIP-1β, MCP-1, OSM, RANTES, TGF-β, TNF-α y TNF-β. Se observa una reacción cruzada muy tenua (0,06 %) con G-CSF.

C. Interferencia con los receptores solubles (sIL6R y sgp-130)

No se observó ninguna reacción cruzada significativa en presencia de 100 ng del receptor sIL6 ni de sgp-130.

Conc. de IL6 (pg/ml)	IL6 medido con 100 ng/ml de sIL6R (pg/ml)	IL6 medido con 100 ng/ml de sgp-130 (pg/ml)
7,5	4,3	8,3
74,0	81,8	76,0
678,0	734,0	671,0

No se observó ninguna interferencia.

C. Precisión

INTRAENSAYO				INTERENSAYO			
Suero	N	$\bar{X} \pm DE$ (pg/ml)	CV (%)	Suero	N	$\bar{X} \pm DE$ (pg/ml)	CV (%)
A	20	147 ± 6,1	4,2	A	20	114 ± 5	4,4
B	20	623 ± 27	4,3	B	20	270 ± 15	5,4

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

D. Exactitud

PRUEBA DE RECUPERACIÓN

Muestra	IL-6 añadida (pg/ml)	IL-6 recuperada (pg/ml)	Recuperación (%)
Suero 1	1066 547 228	1035 541 234	97,1 98,9 102,6
Suero 2	1066 547 228	1110 531 250	104,1 97,1 109,6

PRUEBA DE DILUCIÓN

Muestra	Dilución	Concent. teórica (pg/ml)	Concent. medida (pg/ml)
Suero	1/1	-	966
	1/2	483	478
	1/4	241,5	247
	1/8	120,8	130
	1/16	60,4	54
	1/32	30	23

Las muestras se diluyeron con diluyente de muestras.

E. Tiempo de demora entre el último calibrador y la dispensación de la muestra

Como se muestra a continuación, los resultados del ensayo siguen siendo precisos incluso cuando se dispensa una muestra 30 minutos después de haber añadido los calibradores a los pocillos recubiertos.

TIEMPO DE DEMORA

Muestra	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min
1	61	53	56	61	76
2	196	179	205	213	273
3	1584	1478	1433	1418	1533

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el control 1 o el control 2 no se encuentran dentro del intervalo especificado en la etiqueta del vial, no se pueden utilizar dichos resultados, salvo que se proporcione una explicación satisfactoria sobre la discrepancia.
- Cada laboratorio puede, si lo desea, realizar sus propias mezclas de muestras control, que deberían conservarse congeladas en alícuotas. Los controles que contienen azida interferirán con la reacción enzimática por lo que no se pueden utilizar.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados duplicados de las muestras deben basarse en las Buenas Prácticas de Laboratorio.
- Se recomienda analizar los controles de forma rutinaria como muestras desconocidas para medir la variabilidad del ensayo. La eficacia del ensayo debe monitorizarse con gráficas de control de calidad de los controles.
- Es una buena práctica comprobar visualmente el ajuste de la curva seleccionada por el ordenador.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores se proporcionan solo como guía; cada laboratorio debería establecer su propio intervalo de valores normales.

Como guía, los resultados de 34 muestras séricas de personas aparentemente sanas con bajos niveles de PCR, se encontraron entre 0 y 50 pg/ml. En 31 muestras se obtuvieron valores inferiores a 17 pg/ml.

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Solo para uso diagnóstico *in vitro*.

Los componentes de la sangre humana incluidos en este kit se han analizado mediante métodos europeos aprobados y/o métodos aprobados por la FDA, siendo negativos para HBsAg, anti-VHC y anti-VIH-1 y 2. Ningún método conocido puede ofrecer una garantía total de que los hemoderivados humanos no transmitan hepatitis, SIDA u otras infecciones. Por tanto, la manipulación de reactivos y las muestras de suero o plasma debe realizarse de conformidad con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos y derivados de animales se han obtenido de animales sanos. Los componentes bovinos son originarios de países en los que no se ha notificado EEB. Sin embargo, los componentes que contengan sustancias animales deben tratarse como potencialmente infecciosos.

Evite el contacto con la piel de los reactivos; la solución de parada contiene HCl. En caso de contacto, lávese bien con agua.

No fume, beba, coma ni use cosméticos en la zona de trabajo. No pipetee con la boca. Lleve ropa protectora y guantes desechables.

Para obtener más información, consulte la Hoja de datos de seguridad del material (MSDS).

XVII. BIBLIOGRAFÍA

1. HOUSSIAU F.A. et al., (1988)
IL-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides.
Arth. Rheum., 31:784-788.
2. MOSCOVITZ H. et al., (1994)
Plasma cytokine determination in emergency department patients as predictor of bacteremia and infectious disease severity.
Critical care Medicine, 22:1102-1107.
3. SAKAMOTO K. et al., (1994)
Elevation of circulating interleukin 6 after surgery: factors influencing the serum level.
Cytokine, 6:181-186.
4. KITA Y. et al., (1994)
Evaluation of sequential serum interleukin-6 levels in liver allograft recipients.
Transplantation, 57:1037-1041.
5. LE MOINE O. et al., (1994)
Interleukin-6: an early marker of bacterial infection in decompensated cirrhosis.
J. of Hepatology, 20:819-824.

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CALIBRADORES (μ l)	MUESTRA(S) CONTROLES (μ l)
Tampón de incubación Calibradores (0-5) Muestras, controles	50 100 -	50 - 100
Incube durante 1 hora a temperatura ambiente (18-25°C) con agitación continua a 700 rpm. Aspire el contenido de cada pocillo. Lave 3 veces con 400 μ l de solución de lavado y aspire.		
Conjugado anti-IL-6-HRP Diluyente de muestras	100 50	100 50
Incube durante 1 hora a temperatura ambiente (18-25°C) con agitación continua a 700 rpm. Aspire el contenido de cada pocillo. Lave 3 veces con 400 μ l de solución de lavado y aspire.		
Solución cromogénica	200	200
Incube durante 15 min a temperatura ambiente (18-25°C) con agitación continua a 700 rpm.		
Solución de parada	100	100
Lea en un lector de placas de microvaloración y registre la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (490 nm) frente a 630 (o 650 nm).		

El servicio de instrumentación de Diasource puede ofrecerle la posibilidad de adquirir un protocolo adaptado para este kit que se utilizará en la plataforma Combo Stratec Gemini 2PS + que incluye un archivo de ensayo de protocolo, un archivo de reactivos y consejos para el buen uso del kit en el instrumento.

Si necesita información adicional, póngase en contacto con IVDInstrumentation@diasource.be



pt

Leia todo o protocolo antes de utilizar.

IL-6-ELISA

I. UTILIZAÇÃO PREVISTA

Kit imunoenzimático para a deteção quantitativa in vitro da interleucina -6 (IL-6) no soro.

II. INFORMAÇÃO GERAL

A. Nome do proprietário DIAsource IL-6-ELISA Kit

B. Nº de catálogo : KAP1261 : 96 testes

C. Produzido por : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para assistência técnica ou encomendas, contacte:

Tel : +32 (0)10 84 99 11 - Fax : +32 (0)10 84 99 91

III. FUNDAMENTAÇÃO CLÍNICA

A. Actividades biológicas

A interleucina 6 (IL-6) humana é um polipeptídeo de 184 aa que apresenta sítios de glicosilação potencial de tipo O- e N- e uma homologia significativa com o G-CSF. É produzida por vários tipos de células, entre os quais linfócitos T e B, monócitos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, células mesangiais, astrócitos, células estromais da medula óssea e várias células tumorais. Regula o crescimento e a diferenciação de vários tipos de células que revestem um papel fundamental no sistema imunitário e hematopoiético e na resposta inflamatória. Estes efeitos múltiplos são integrados numa rede citoquímica complexa em que as diferentes citocinas induzem a IL-6 (IL-1, TNF, PDGF, IFNs, ...) ou são induzidas pela IL-6, com efeitos finais que derivam de atividades sinérgicas ou antagonísticas entre a IL-6 e outras citocinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IFN γ , IL-3, GM-CSF, M-CSF, CSF,...). A IL-6 induz a maturação final dos linfócitos B em células que produzem anticorpos e é um fator importante do crescimento das células do mieloma/plasmocitoma. (Co-)estimula o crescimento dos linfócitos e a diferenciação em linfócitos T citotóxicos. Promove o desenvolvimento dos megacariócitos e, por efeito sinérgico com outras citocinas, estimula a proliferação dos precursores multipotentes hematopoiéticos. Além disso, pode induzir a diferenciação e inibição do crescimento de algumas linhas celulares tumorais leucémicas ou não hematopoiéticas. A IL-6 é também um indutor importante das reações da fase aguda em resposta à inflamação ou a um dano tecidual. Juntamente com a IL-1 e o TNF, induz a síntese das proteínas da fase aguda (APP) por parte dos hepatócitos, sendo cada citocina ou combinação de citocinas caracterizadas por um padrão de produção preferencial de APP. A IL-6 interage com o sistema neuroendócrino, induzindo, por exemplo, a produção de ACTH. Assim, a IL-6 é uma citocina pleiotrópica que pode executar múltiplas atividades endócrinas, parácrinas e provavelmente autócrinas em vários tecidos.

B. Aplicação clínica

Na maior parte dos controlos normais, os níveis no soro de IL-6 não podem ser detetados; contudo, nas situações com condições inflamatórias graves, como uma septicémia, podem ser detetadas quantidades elevadas de IL-6. O aumento de níveis de IL-6 no soro antecede o das proteínas na fase aguda, por exemplo, na fase pós-operatória e pode por isso considerar-se um parâmetro sensível e precoce, útil para a avaliação de um estado inflamatório.

A presença de IL-6 no soro já foi descrita em combinação com danos tecidulares cirúrgicos ou traumáticos, doenças infeciosas, doenças autoimunes como a artrite, rejeição de transplante, cirrose hepática alcoólica, neoplasias malignas, etc.

IV. PRINCIPIOS DO MÉTODO

O DIAsource IL-6-ELISA é um imunoensaio enzimático de sensibilidade amplificada em fase sólida em placas de microtitulação. O ensaio utiliza anticorpos monoclonais (mAbs) dirigidos contra epítopos distintos da IL-6. Os calibradores e as amostras reagem contra o anticorpo de monoclonal de captura (mAb 1) que reveste o poço de microtitulação e com um anticorpo monoclonal (mAb 2) marcado com peroxidase de rábano (HRP). Após um período de incubação que permite a formação de uma sandwich: mAb revestido - IL-6 humana - mAb 2 - HRP, a placa de microtitulação é lavada para remover o anticorpo marcado com enzima não ligado. O anticorpo marcado com enzima ligado é medido mediante uma reação cromogénica. É adicionada a solução cromogénica (TMB) e procede-se com a incubação. A reação é interrompida com a adição de solução de bloqueio e, em seguida, a placa de microtitulação é lida no comprimento de onda adequado. A quantidade de substrato transformado é determinada colorimetricamente medindo a absorvência, que é proporcional à concentração de IL-6.

É representada uma curva de calibração e a concentração de IL-6 nas amostras é determinada mediante interpolação da curva de calibração. A utilização do leitor ELISA (linearidade até 3 unidades DO), em conjunto com um método sofisticado de redução de dados (redução de dados policromática) garante uma sensibilidade elevada no intervalo baixo dos valores e um intervalo alargado de calibração.

V. REAGENTES FORNECIDOS

Reagentes	Kit 96 testes	Código de cor	Reconstituição
Placa de microtitulação com 96 poços revestidos com anti-IL-6 (anticorpos monoclonais)	96 poços	azul	Pronta a usar
AB HRP Conjugado: anti-IL-6 (anticorpos monoclonais) marcado com rábano em tampão de borato com albumina de soro bovino e timol	1 frasco 11 ml	vermelho	Pronto a usar
CAL N Calibrador N=0-5 (As concentrações exatas dos calibradores são indicadas nos rótulos dos frascos) em plasma humano com albumina de soro bovino, benzamidina e timol	6 frascos liofiliz.	amarelo	Adicionar 1 ml de água destilada
DIL SPE Diluente da amostra: plasma humano com albumina de soro bovino, benzamidina e timol	2 frascos liofiliz.	preto	Adicionar água destilada (consultar no rótulo os volumes exatos)
INC BUF Tampão de incubação: tampão de borato com albumina de soro bovino, benzamidina e timol.	1 frasco 11 ml	preto	Pronto a usar
WASH SOLN CONC Tampão de lavagem (TRIS-HCl)	1 frasco 10 ml	castanho	Dilua 200 x com água destilada (use um agitador magnético).
CONTROL N Controlos - N = 1 ou 2 (As concentrações exatas dos calibradores são indicadas nos rótulos dos frascos) em plasma humano com timol	2 frascos liofiliz.	prata	Adicionar 1 ml de água destilada
CHROM TMB Solução cromogénica TMB	1 frasco 25 ml	branco	Pronta a usar
STOP SOLN Solução de bloqueio: HCl 2N	1 frasco 12 ml	branco	Pronta a usar

Note: 1. Usar o diluente da amostra para diluir as amostras.
2. 1 pg da preparação do calibrador é equivalente a 100 mIU do 1º padrão internacional 89/548 do NIBSC.

VI. REAGENTES NÃO FORNECIDOS

O material seguinte é necessário, mas não é fornecido com o kit.

- Água destilada de qualidade elevada
- Pipetas para dispensar de 50 µl, 100 µl 200 µl, 1 ml e 10 ml (recomenda-se usar pipetas precisas com pontas de plástico descartável)
- Agitador tipo vortex
- Agitador magnético
- Agitador horizontal para microplacas de 700 ± 100 rpm
- Lavadora de placas de microtitulação
- Leitor de microplacas para leituras a 450, 490 e 650 nm (leitura policromática) ou para leituras a 450 e 650 nm (leitura bicromática)
- Ferramentas adicionais: o ELISA-AID™, necessário para a leitura policromática das placas (ver parágrafo XI.A) pode ser adquirido junto a Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 EUA.

VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- A. Calibradores:** Reconstituir os calibradores com 1 ml de água destilada.
- B. Controlos:** Reconstituir os controlos com 1 ml de água destilada.
- C. Diluente da amostra:** Reconstituir o diluente da amostra adicionando água destilada até ao volume indicado no rótulo do frasco.
- D. Solução de lavagem de trabalho:** Preparar a quantidade necessária de solução de lavagem de trabalho adicionando 199 partes de água destilada a 1 parte de tampão de lavagem concentrado (200x). Usar um agitador magnético para tornar a solução homogénea. A solução de trabalho deve ser descartada ao final do dia.

VIII. CONSERVAÇÃO E PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

- Antes da abertura ou da reconstituição, os componentes do kit mantêm-se estáveis a 2- 8°C até à data indicada em cada rótulo.
- As tiras-reagentes não usadas devem ser conservadas a 2- 8°C num recipiente hermeticamente fechado que contenha dessecante, até ao prazo de validade.
- Após a reconstituição, os calibradores, os controlos e o diluente da amostra mantêm-se estáveis por 4 dias a 2-8°C. Em caso de períodos de conservação muito longos, devem ser aliquotados e conservados a -20°C até um máximo de 2 meses. Evitar ciclos repetidos de congelação e descongelação das amostras.
- A solução de lavagem concentrada mantém-se estável à temperatura ambiente (18-25°C) até ao prazo de validade.
- A solução de lavagem de trabalho deve ser recém-preparada caso a caso e usada no mesmo dia da preparação.
- Após abrir o frasco, o conjugado mantém-se estável até ao prazo de validade indicado no rótulo, se conservado a 2-8°C no frasco original bem fechado.
- As alterações no aspecto físico dos reagentes podem ser sinais de instabilidade ou deterioração.

IX. RECOLHA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

- Após realizar a coagulação e centrifugação, o soro deverá ser removido logo que possível do coágulo de eritrócitos e conservado a 4°C. Se não forem utilizadas de imediato, as amostras deverão ser conservadas a -20 °C durante um máximo de 2 meses, e a -70 °C por períodos mais longos (um ano, no máximo).
- Evitar ciclos repetidos de congelação e descongelação das amostras.
- Antes da utilização, todas as amostras devem estar à temperatura ambiente (18-25°C). Recomenda-se agitar todos os reagentes e as amostras antes de os utilizar.
- As condições de colheita podem influenciar os valores. Adotar as máximas precauções durante a recolha para evitar que eventuais impurezas contidas nas amostras possam estimular a produção de IL-6 por parte das células hemáticas e aumentar incorretamente os níveis de IL-6 no soro.
- As provetas de colheita devem ser apirogénicas.

X. PROCEDIMENTO

A. Notas de manipulação

- Não usar o kit e os seus componentes após o prazo de validade.
- Não misturar reagentes de lotes diferentes.
- Antes da utilização, todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente (18-25°C).
- Misturar delicadamente todos os reagentes e as amostras agitando-os ou rodando-os.

Realizar os calibradores, os controlos e as amostras em duplicado. Recomenda-se alinhá-los verticalmente.

Utilizar um recipiente de plástico limpo para preparar a solução de lavagem.

A fim de evitar contaminações cruzadas, mudar a ponta da pipeta sempre que se utilize um novo reagente ou amostra.

Evitar pipetas com partes metálicas ao dispensar a solução cromógena e a solução de bloqueio.

Pipetas de alta precisão ou um sistema de pipetagem automatizado melhoram a precisão da dosagem.

Respeitar os tempos de incubação.

Para evitar desvios, o intervalo entre a pipetagem do primeiro calibrador e a última amostra deve limitar-se ao tempo indicado na secção XIII.E (Tempo decorrido).

Preparar uma curva de calibração para cada sessão analítica, não utilizar dados de análises anteriores.

Dispensar a solução cromógena dentro de 15 minutos a contar da lavagem da placa de microtitulação.

Durante a incubação com a solução cromógena, evitar a luz direta do sol na placa de microtitulação.

Cada poço pode ser usado apenas uma vez.

B. Procedimento

1. Selecionar o número de tiras-reagente necessárias para o teste. As tiras-reagente não utilizadas devem ser hermeticamente guardadas de volta no recipiente com um dessecante e conservadas a 2-8°C.
2. Fixar as tiras-reagente na estrutura de suporte.
3. Pipetar 50 µl de tampão de incubação em cada poço.
4. Pipetar 100 µl de cada calibrador, controlo e amostra nos poços apropriados.
5. Incubar durante 1 hora à temperatura ambiente (18-25°C) num agitador horizontal a 700 ± 100 rpm.
6. Aspirar o líquido de cada poço.
7. Lavar a placa 3 vezes:
 - dispensando 0,4 ml de solução de lavagem em cada poço
 - aspirando o conteúdo de cada poço
8. Pipetar 100 µl de conjugado anti-IL-6-HRP e 50 µl de diluente de amostras em cada poço.
9. Incubar durante 1 hora à temperatura ambiente (18-25°C) num agitador horizontal a 700 ± 100 rpm.
10. Aspirar o líquido de cada poço.
11. Lavar a placa 3 vezes:
 - dispensando 0,4 ml de solução de lavagem em cada poço
 - aspirando o conteúdo de cada poço
12. Pipetar 200 µl de solução cromógena em cada poço dentro de 15 minutos a contar da lavagem.
13. Incubar a placa de microtitulação durante 15 minutos à temperatura ambiente (18-25°C) num agitador horizontal a 700 ± 100 rpm ; evitar a luz solar direta.
14. Pipetar 100 µl de solução de bloqueio em cada poço.
15. Ler as absorbências a 450 nm e 490 nm (filtro de referência a 630 nm ou 650 nm) dentro de 3 horas e calcular os resultados tal como descrito na secção XI.

XI. CÁLCULO DOS RESULTADOS

A. Leitura policromática

1. Neste caso, a elaboração dos dados será efetuada pelo software ELISA-AID™.
2. A placa é lida a 450 nm em relação a um filtro de referência regulado a 650 nm (ou 630 nm).
3. Em seguida, é realizada uma segunda leitura a 490 nm em relação ao mesmo filtro de referência.
4. O software ELISA-AID™ controlará automaticamente o leitor e integrará ambas as leituras mediante um modelo policromático. Esta técnica pode gerar valores de DO até 10.
5. O princípio da elaboração policromática dos dados é o seguinte:
 - $X_i = OD\text{ a }450\text{ nm}$
 - $Y_i = OD\text{ a }490\text{ nm}$
 - Utilizando uma regressão linear padrão não ponderada, os parâmetros A & B são calculados: $Y = A \cdot X + B$
 - Se $X_i < 3$ unidades DO, então o X calculado = X_i
 - Se $X_i > 3$ unidades DO, então o X calculado = $(Y_i - B) / A$
 - Ajusta-se a curva logística de 4 parâmetros para gerar a curva de calibração.
 - A concentração de IL-6 nas amostras é determinada mediante interpolação na curva de calibração.

B. Leitura bicromática

1. Ler a placa a 450 nm em relação a um filtro de referência regulado a 650 nm (ou 630 nm).
2. Calcular a média das determinações em duplicado.
3. Representar a curva de calibração nas ordenadas os valores médios dos DO de cada calibrador em função da concentração correspondente de IL-6 nas abcissas e conectando os pontos.
4. Determinar as concentrações de cada controlo e amostra mediante interpolação na curva de calibração.
5. É possível utilizar um sistema de interpolação dos dados automatizado para simplificar estes cálculos. Com um sistema automático de interpolação dos dados, recomenda-se um ajuste da curva mediante função logística de 4 parâmetros.

XII. DADOS TÍPICOS

Os dados indicados em seguida são exclusivamente indicativos e não deverão ser utilizados em substituição da curva de calibração gerada em tempo real.

IL-6-ELISA		Unidade DO Modelo policromático
Calibrador	0 pg/ml 23,3 pg/ml 68 pg/ml 201 pg/ml 633 pg/ml 2560 pg/ml	79 125 193 408 1036 3579

XIII. DESEMPENHO E LIMITAÇÕES

A. Limite de deteção

Foram analisados vinte calibradores com padrão zero juntamente com um conjunto de outros calibradores. O limite de deteção, definido como a concentração aparente de dois desvios padrão acima da média de DO no padrão zero, foi de 2 pg/ml.

B. Especificidade

Não foram detetadas reações cruzadas significativas em presença de 50 ng de IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN-α, IFN-γ, LIF, MIP-1α, MIP-1β, MCP-1, OSM, RANTES, TGF-β, TNF-α e TNF-β. Foi detetada uma reação cruzada muito leve (0,06%) com o G-CSF.

Interferência com receptores solúveis (sIL6R e sgp-130)

Não foram detetadas reações cruzadas significativas em presença de 100 ng do recetor sIL6 e sgp-130.

Conc. de IL-6 (pg/ml)	IL-6 medida com 100 ng/ml de sIL6R (pg/ml)	IL6 measured with 100 ng/ml of sgp-130 (pg/ml)
7,5	4,3	8,3
74,0	81,8	76,0
678,0	734,0	671,0

Não foram detetadas interferências

C. Precisão

INTRAENSAIO				INTERENSAIO			
Soro	N	$\bar{X} \pm SD$ (pg/ml)	CV (%)	Soro	N	$\bar{X} \pm SD$ (pg/ml)	CV (%)
A	20	147 ± 6,1	4,2	A	20	114 ± 5	4,4
B	20	623 ± 27	4,3	B	20	270 ± 15	5,4

SD: desvio padrão, CV coeficiente de variação

D. Exatidão

TESTE DE RECUPERAÇÃO

Amostra	IL-6 adicionada (pg/ml)	L-6 recuperada (pg/ml)	Recuperação (%)
Soro 1	1066 547 228	1035 541 234	97,1 98,9 102,6
Soro 2	1066 547 228	1110 531 250	104,1 97,1 109,6

TESTE DE DILUIÇÃO

Amostra	Diluição	Concent. teórica (pg/ml)	Concent. medida (pg/ml)
Soro	1/1	-	966
	1/2	483	478
	1/4	241,5	247
	1/8	120,8	130
	1/16	60,4	54
	1/32	3	23

As amostras foram diluídas com diluente da amostra.

E. Tempo decorrido entre o último calibrador e a dispensação da amostra

Como é exibido na seguinte tabela, a dosagem mantém-se exata mesmo quando uma amostra é adicionada 30 minutos após a adição dos calibradores nos poços revestidos.

TEMPO DECORRIDO

Amostra	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min
1	61	53	56	61	76
2	196	179	205	213	273
3	1584	1478	1433	1418	1533

XIV. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

- Se os resultados obtidos doseando o Controlo 1 e o Controlo 2 não se encontrarem dentro do intervalo de limites indicado no rótulo dos frascos, não convém utilizar os resultados obtidos, a não ser que se encontre uma justificação apropriada para a discrepância.
- Cada laboratório pode preparar as suas próprias misturas de soros a utilizar como controlo, que devem ser conservadas congeladas e aliquotadas. Os controlos que contêm azida interferem com a reação enzimática e, portanto, não podem ser utilizados.
- Os critérios de aceitação das diferenças entre os resultados em duplicado das amostras devem basear-se nas boas práticas de laboratório.
- Recomenda-se o ensaio dos controlos com regularidade como amostras desconhecidas para medir a variabilidade do ensaio. A eficácia do ensaio deve ser monitorizada com tabelas de controlo de qualidade dos controlos.
- É uma boa prática verificar visualmente o ajuste da curva selecionada pelo computador.

XV. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Estes valores são fornecidos apenas como orientação; cada laboratório deve estabelecer os seus intervalos normais de valores.

Como referência, os resultados de 34 amostras de soro pertencentes a pessoas aparentemente sãs com níveis baixos de PCR apresentam valores dentro do intervalo 0 - 50 pg/ml. Em 31 amostras, obtiveram-se valores inferiores a 17 pg/ml.

XVI. AVISOS E PRECAUÇÕES

Segurança

O kit destina-se exclusivamente a diagnóstico in vitro.

Os componentes de sangue humano presentes no kit foram analisados com métodos europeus aprovados ou métodos aprovados pela FDA e resultaram negativos para HBs Ag, anti-HCV, anti-HIV1 e anti-HIV2. Nenhum método conhecido pode oferecer uma garantia total de que os hemoderivados humanos não transmitam hepatite, SIDA ou outras infecções.

Manusear estes reagentes ou amostras de soro ou plasma em conformidade com os procedimentos de segurança em vigor.

Todos os produtos de origem animal ou derivados provêm de animais sãos. Os componentes de origem bovina provêm de países onde não foram denunciados casos de EEB. É, contudo, necessário considerar os produtos de origem animal como potenciais fontes de infecções.

Evitar qualquer contacto da pele com os reagentes, a solução de bloqueio contém HCl. Em caso de contacto, lavar abundantemente com água.

Não fumar, beber, comer ou usar cosméticos na área de trabalho. Não pipetar os reagentes com a boca. Utilizar fatos de proteção e luvas descartáveis.

Para mais informações, consulte Folha de Dados de Segurança do Material (MSDS).

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. HOUSIAU F.A. et al., (1988)
IL-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides.
Arth. Rheum., 31:784-788.

2. MOSCOVITZ H. et al., (1994)
Plasma cytokine determination in emergency department patients as predictor of bacteremia and infectious disease severity.
Critical care Medicine, 22:1102-1107.
3. SAKAMOTO K. et al., (1994)
Elevation of circulating interleukin 6 after surgery : factors influencing the serum level.
Cytokine, 6:181-186.
4. KITA Y. et al., (1994)
Evaluation of sequential serum interleukin-6 levels in liver allograft recipients.
Transplantation, 57:1037-1041.
5. LE MOINE O. et al., (1994)
Interleukin-6 : an early marker of bacterial infection in decompensated cirrhosis.
J. of Hepatology, 20:819-824.

XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

CALIBRADORES (µl)	AMOSTRA(S) CONTROLOS (µl)	
Tampão de incubação Calibradores (0-5) Amostras, Controlos	50 100 -	50 - 100
Incubar por 1 hora à temperatura ambiente (18-25°C) agitando constantemente a 700 rpm. Aspirar os conteúdos de cada poço. Lavar 3 vezes com 400 µl de solução de lavagem e aspirar.		
Conjugado Anti-IL-6 -HRP Diluente de Amostra	100 50	100 50
Incubar por 1 hora à temperatura ambiente (18-25°C) agitando constantemente a 700 rpm. Aspirar os conteúdos de cada poço. Lavar 3 vezes com 400 µl de solução de lavagem e aspirar.		
Solução cromógena	200	200
Incubar por 15 min à temperatura ambiente (18-25°C) agitando constantemente a 700 rpm.		
Solução de bloqueio	100	100
Ler no leitor de placas de micro titulação e registar a absorbância de cada poço a 450 nm (contra 630 ou 650 nm)		

O Serviço de Instrumentação da Diasource pode oferecer a possibilidade de adquirir um protocolo adaptado para este kit para ser usado na plataforma Stratec Gemini 2PS + Combo, incluindo arquivo de ensaio de protocolo, arquivo de reagente e dicas para o bom uso do kit no instrumento.

Se precisar de mais informações, entre em contato com

IVDInstrumentation@diasource.be



el

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

IL-6-ELISA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ανοσοενζυμομετρικός προσδιορισμός για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης ιντερλευκίνης-6 (IL-6) σε ορό.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. Εμπορική ονομασία: Kit IL-6-ELISA της DIAsource
- B. Αριθμός καταλόγου: KAP1261: 96 προσδιορισμοί
- C. Κατασκευάζεται από την: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Φαξ: +32 (0)10 84.99.91

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Βιολογική δράση

Η ανθρώπινη ιντερλευκίνη 6 (IL-6) είναι ένα πολυπεπτίδιο 184 αμινοξέων με δυνητικές Ο και N θέσεις γλυκοζυλίωσης και σημαντική ομολογία με τον παράγοντα G-CSF. Παράγεται από διάφορα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των T- και B-κυττάρων, μονοκυττάρων, ινοβλαστών, κερατινοκυττάρων, ενδοθηλιακών κυττάρων, μεσαγγειακών κυττάρων, αστροκυττάρων, στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών και αρκετών νεοπλασματικών κυττάρων. Ρυθμίζει την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση διαφόρων κυτταρικών τύπων με κύριες δράσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα, την αιμοποίηση και τη φλεγμονή. Οι πολλαπλές αυτές δράσεις αποτελούν μέρος ενός πολύπλοκου δικτύου κυτταροκινών, όπου αρκετές κυτταροκίνες (IL-1, TNF, PDGF, IFN,...) επάγονται από την IL-6 και οι τελικές επιδράσεις είναι αποτέλεσμα είτε συνεργικών είτε ανταγωνιστικών δράσεων μεταξύ της IL-6 και των υπόλοιπων κυτταροκινών (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IFN γ , IL-3, GM-CSF, M-CSF, CSF,...). Η IL-6 επάγει την τελική ωρίμανση των B-κυττάρων σε κύτταρα παραγωγής αντισωμάτων και αποτελεί ισχυρό αυξητικό παράγοντα για κύτταρα μυελώματος/πλασματοκυττώματος. Διεγίρει (και σε συνδυασμό) την ανάπτυξη των T-κυττάρων και τη διαφοροποίησή τους σε κυτταροτοξικά T-κύτταρα. Προάγει την ανάπτυξη των μεγακαρυοκυττάρων και δρα συνεργικά με άλλες κυτταροκίνες για τη διέγερση πολυδύναμων αιμοποιητικών προδρόμων. Μπορεί επίσης να επάγει αναστολή της διαφοροποίησης και της ανάπτυξης ορισμένων λεγχαμικών -ή μη αιμοποιητικών νεοπλασματικών κυτταρικών σειρών. Η IL-6 είναι επίσης κύριος επαγγέλας των αντιδράσεων οξείας φάσης ως απάντησης σε φλεγμονή ή τραυματισμό ιστών. Μαζί με τα IL-1 και TNF, επάγει τη σύνθεση πρωτεΐνων οξείας φάσης (APP) από ηπατοκύτταρα, με μοτίβα προτίμησης των παραγόμενων APP, ανάλογα με την κυτταροκίνη ή το συνδυασμό τους. Η IL-6 αλληλεπιδρά επίσης με το νευροενδοκρινικό σύστημα, π.χ. επάγοντας την παραγωγή ACTH. Έτσι, Η IL-6 αποτελεί μία πλειοτροπική κυτταροκίνη με πολλαπλές ενδοκρινείς, παρακρινείς και πιθανώς αυτοκρινείς δράσεις σε διαφορετικούς τύπους ιστών.

B. Κλινικές εφαρμογές

Αν και οι περισσότεροι φυσιολογικοί οροί ελέγχου παρουσιάζουν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα IL-6, τεράστιες ποσότητες IL-6 ανιχνεύονται σε βαριές φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως η σηψαμία. Η αύξηση της IL-6 στον ορό προηγείται εκείνης των πρωτεΐνων οξείας φάσης π.χ. ως μετεγχειρητικό φαινόμενο, και ενδέχεται για το λόγο αυτό να αποτελεί μία ευαίσθητη πρώιμη παράμετρο για τη διερεύνηση φλεγμονώδων καταστάσεων.

Η IL-6 ορού έχει ήδη περιγραφεί σε συνάρτηση με χειρουργικούς ή μη τραυματισμούς ιστών, λοιμώδεις και αυτοάνοσες νόσους, συμπεριλαμβανομένης της αρθρίτιδας, της απόρριψης μοσχεύματος, της αλκοολικής κίρρωσης ήπατος, κακοηθών νεοπλασιών κτλ.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο προσδιορισμός IL-6-ELISA της DiaSource είναι ένας ενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός ενισχυμένης ευαισθησίας, στερεής φάσης, ο οποίος εκτελείται σε πλάκες μικροτιτλοδότησης. Ο προσδιορισμός χρησιμοποιεί μονοκλωνικά αντισώματα (MAbs) που κατευθύνονται εναντίον διακριτών επιτόπων της IL-6. Οι βαθμονομητές και τα δείγματα αντιδρούν με το μονοκλωνικό αντίσωμα σύλληψης (MAb 1) που είναι επιστρωμένο στην υποδοχή της πλάκας μικροτιτλοδότησης και με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα (MAb 2) σημασμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP). Μετά από μια περίοδο επώασης που επιτρέπεται το σχηματισμό ενός σάντουιτς επιστρωμένο MAb 1 – ανθρώπινη IL-6 – MAb 2 – HRP, η πλάκα μικροτιτλοδότησης υποβάλλεται σε πλύση για να απομακρυνθεί το σημασμένο με ένζυμο αδέσμεντο αντίσωμα. Το σημασμένο με ένζυμο δεσμευμένο αντίσωμα μετράται μέσω μιας χρωμογόνου αντιδρασης. Προστίθεται και εποιάζεται χρωμογόνο διάλυμα (TMB έτοιμο για χρήση). Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη ανασχετικού διαλύματος και στη συνέχεια γίνεται ανάγνωση της πλάκας μικροτιτλοδότησης στο κατάλληλο μήκος κόματος. Η ποσότητα μετατροπής του υποστρώματος καθορίζεται χρωματομετρικά μετρώντας την απορρόφηση, η οποία είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση της IL-6.

Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζεται η συγκέντρωση της IL-6 στα δείγματα με αναγωγή από την καμπύλη βαθμονόμησης. Η χρήση του συστήματος ανάγνωσης ELISA (γραμμικότητα έως 3 μονάδες OD) και μιας πολύπλοκης μεθόδου αναγωγής δεδομένων (αναγωγή πολυχρωματικών δεδομένων) έχουν ως αποτέλεσμα υψηλή ευαισθησία στο καμπηλό πεδίο τιμών και στο εκτεταμένο πεδίο τιμών βαθμονόμησης.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 προσδιορισμών	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση
IL Πλάκα μικροτιτλοδότησης με 96 υποδόχες επιστρωμένες με αντί IL-6 (μονοκλωνικά αντισώματα)	96 υποδόχες	μπλε	Έτοιμο για χρήση
Ab HRP Σύνεγμα: Αντι-IL-6 (μονοκλωνικά αντισώματα) σε ρυθμιστικό διάλυμα βορικών με βάσεια ορολευκωματίνη και θυμόλη	1 φιαλίδιο 11 ml	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
CAL N Βαθμονόμησης N = 0 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο πλάσμα με βάσεια ορολευκωματίνη, βενζαμιδίνη και θυμόλη	6 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού
DIL SPE Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων: ανθρώπινος πλάσμα με βάσεια ορολευκωματίνη, βενζαμιδίνη και θυμόλη	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	μαύρο	Προσθέστε απεσταγμένο νερό (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων)
INC BUF Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης: Ρυθμιστικό διάλυμα βορικών με βάσεια ορολευκωματίνη, βενζαμιδίνη και θυμόλη	1 φιαλίδιο 11 ml	μαύρο	Έτοιμο για χρήση
WASH SOLN CONC Διάλυμα πλύσης (Tris-HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 200 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
CONTROL N πλάσμα ελέγχου - N = 1 ή 2 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο πλάσμα με θυμόλη	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	πράσινο	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού

CHROM TMB	1 φιαλίδιο 25 ml	λευκό	Έτοιμο για χρήση
STOP SOLN	1 φιαλίδιο 12 ml	λευκό	Έτοιμο για χρήση

Ανασχετικό διάλυμα: HCl 2N

Σημείωση: 1. Χρησιμοποιήστε διάλυμα αραίωσης δειγμάτων για αραίωση των δειγμάτων.
2. 1 pg των παρασκευάσματος του βαθμονόμητη είναι ισοδύναμο με 100 mIU των NIBSC 1° IS 89/548.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

1. Απεσταγμένο νερό υψηλής ποιότητας
2. Πιπέτες για διανομή: 50 μl, 100 μl, 200 μl, 1 ml και 10 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
3. Αναμείκητης στροβιλισμού
4. Μαγνητικός αναδευτήρας
5. Οριζόντια συσκευή ανάδευσης πλακών μικροτιτλοδότησης με δυνατότητα 700 rpm ± 100 rpm
6. Συσκευή πλύσης για πλάκες μικροτιτλοδότησης
7. Συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης με δυνατότητα ανάγνωσης στα 450 nm, 490 nm και 650 nm (σε περίπτωση πολυχρωματικής ανάγνωσης) ή με δυνατότητα ανάγνωσης στα 450 nm και 650 nm (διχρωματική ανάγνωση)
8. Προαριτικός εξοπλισμός: Ο εξοπλισμός ELISA-AID™ που είναι απαραίτητος για την πολυχρωματική ανάγνωση (δείτε την παράγραφο XI.A.) μπορεί να αγοραστεί από την Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- Βαθμονόμητές:** Ανασυστήστε τους βαθμονόμητές με 1 ml απεσταγμένου νερού.
- Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 1 ml απεσταγμένου νερού.
- Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων:** Ανασυστήστε το διάλυμα αραίωσης δειγμάτων στον όγκο που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου με απεσταγμένο νερό.
- Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 199 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (200x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8°C.
- Οι μη χρησιμοποιημένες ταινίες πρέπει να φυλάσσονται στους 2-8°C, σε σφραγισμένη σακούλα που περιέχει αποξηραντικό παράγοντα, μέχρι την ημερομηνία λήξης.
- Μετά την ανασύσταση, οι βαθμονόμητές, οι οροί ελέγχου και το διάλυμα αραίωσης δειγμάτων παραμένουν σταθερά επί 4 ημέρες στους 2-8°C. Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, θα πρέπει να δημιουργηθούν κλάδατα/δόσεις μίας χρήσης και να διατηρηθούν σε θερμοκρασία -20°C επί 2 μήνες το μέγιστο. Αποφύγετε τους επανειλημμένους κύκλους απόψυξης-κατάψυξης.
- Το συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης είναι σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) μέχρι την ημερομηνία λήξης.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, το σύνεγμα παραμένει σταθερό έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8°C.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΛΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Ο ορός θα πρέπει να απομακρυνθεί όσο το δυνατόν νωρίτερα από το πήγμα των ερυθροκυττάρων μετά την πήξη και τη φυγοκέντριση και να διατηρηθεί στους 4°C. Αν τα δείγματα δεν χρησιμοποιηθούν αμέσως, θα πρέπει να διατηρηθούν στους -20°C επί 2 μήνες το μέγιστο και στους -70°C για μεγαλύτερης διάρκειας φύλαξη (έως ένα έτος).
- Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.

- Φέρετε όλα τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) πριν από τη χρήση. Συνιστάται η ανάμειξη των δειγμάτων σε συσκευή στροβιλισμού πριν από τη χρήση.
- Οι συνθήκες δειγματοληψίας μπορούν να επηρεάσουν τις τιμές. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να λαμβάνονται αυστηρά μέτρα προφύλαξης κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας για την αποφυγή προσμίξεων στα δείγματα λήψης, τα οποία θα διέγειραν την παραγωγή IL-6 από αιμοκύτταρα και θα αύξαναν εσφαλμένα τις τιμές της IL-6 στον ορό.
- Τα σωληνάρια συλλογής θα πρέπει να είναι ελεύθερα πυρογενών.

X. ΑΙΑΣΙΚΑΣΙΑ

A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό

Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ.

Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) πριν από τη χρήση.

Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση.

Εκτελέστε εις διπλούν ανάληψη των βαθμονομητών, των ορών ελέγχου και των δειγμάτων. Συνιστάται κάθετη ευθυγράμμιση.

Χρησιμοποιήστε ένα καθαρό, πλαστικό δοχείο για να ετοιμάσετε το διάλυμα πλύνσης.

Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση.

Για τη διανομή του χρωμογόνου διαλύματος και του ανασχετικού διαλύματος αποφύγετε πιπέτες με μεταλλικά μέρη.

Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπέτων υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένων εξοπλισμού διανομής με πιπέτες.

Τηρείτε τους χρόνους επώασης.

Για να αποφύγετε τη μετατόπιση, ο χρόνος μεταξύ της διανομής με πιπέτα του πρώτου βαθμονομητή και του τελευταίου δείγματος πρέπει να περιορίζεται στο χρονικό διάστημα που αναφέρεται στην ενότητα XIII, παράγραφος Ε (Μεσοδιάστημα).

Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.

Διανείμετε το χρωμογόνο διάλυμα εντός 15 λεπτών από την πλύση της πλάκας μικροτιτλοδότησης.

Κατά τη διάρκεια της επώασης με το χρωμογόνο διάλυμα, αποφύγετε την άμεση έκθεση της πλάκας μικροτιτλοδότησης στο ηλιακό φως.

Κάθε πηγάδι μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο μία φορά.

B. Διαδικασία

1. Επιλέξτε τον απαιτούμενο αριθμό ταινιών για την ανάλυση. Οι μη χρησιμοποιημένες ταινίες πρέπει να ζανασφραγίστονται μέσα στη σακούλα με τον αποξηραντικό παράγοντα και να φυλαχτούν σε θερμοκρασία 2-8°C.
2. Ασφαλίστε τις ταινίες μέσα στο πλαίσιο στήριξης.
3. Διανείμετε με πιπέτα 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος επώασης σε όλες τις υποδοχές.
4. Διανείμετε με πιπέτα 100 μl από κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα στις κατάλληλες υποδοχές.
5. Επωάστε επί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) σε οριζόντιο αναδευτήρα στις 700 rpm ± 100 rpm.
6. Αναρροφήστε το υγρό από κάθε υποδοχή.
7. Πλύνετε την πλάκα 3 φορές:
 - διανέμοντας 0,4 ml διαλύματος πλύσης σε κάθε υποδοχή.
 - αναρροφώντας το περιεχόμενο κάθε υποδοχής
8. Διανείμετε με πιπέτα 100 μl συζεύγματος Αντι-IL-6-HRP και 50 μl διαλύματος αραίωσης δειγμάτων σε όλες τις υποδοχές.
9. Επωάστε επί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) σε οριζόντιο αναδευτήρα στις 700 rpm ± 100 rpm.
10. Αναρροφήστε το υγρό από κάθε υποδοχή.
11. Πλύνετε την πλάκα 3 φορές:
 - διανέμοντας 0,4 ml διαλύματος πλύσης σε κάθε υποδοχή
 - αναρροφώντας το περιεχόμενο κάθε υποδοχής
12. Διανείμετε με πιπέτα 200 μl χρωμογόνου διαλύματος σε κάθε υποδοχή εντός 15 λεπτών από το βήμα πλύσης.
13. Επωάστε την πλάκα μικροτιτλοδότησης επί 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) σε οριζόντιο αναδευτήρα στις 700 rpm ± 100 rpm, αποφύγετε την άμεση έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία.
14. Διανείμετε με πιπέτα 100 μl ανασχετικού αντιδραστηρίου σε κάθε υποδοχή
15. Κάντε ανάγνωση των απορροφήσεων στα 450 nm και 490 nm (φίλτρο αναφοράς 630 nm ή 650 nm) εντός 1 ώρας και υπολογίστε τα αποτελέσματα όπως περιγράφεται στην ενότητα XI.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

A. Πολυχρωματική ανάγνωση:

1. Στην περίπτωση αυτή, την επεξεργασία των δεδομένων θα κάνει το λογισμικό του ELISA-AID™.

2. Η ανάγνωση της πλάκας γίνεται πρώτα στα 450 nm έναντι ενός φίλτρου αναφοράς που ρυθμίζεται στα 650 nm (ή τα 630 nm).
3. Εκτελέσται δεύτερη ανάγνωση στα 490 nm έναντι του ίδιου φίλτρου αναφοράς.
4. Το λογισμικό του ELISA-AID™ θα ενεργοποιήσει αυτόματα τη συσκευή ανάγνωσης και θα ενσωματώσει και τις δύο μετρήσεις σε ένα πολυχρωματικό μοντέλο. Αυτή η τεχνική μπορεί να δημιουργήσει οπτικές πυκνότητες (OD) έως και 10.
5. Βασική αρχή της επεξεργασίας των πολυχρωματικών δεδομένων έχει ως εξής:
 - $Xi = OD$ στα 450 nm
 - $Yi = OD$ στα 490 nm
 - Χρησιμοποιώντας τυπική μη σταθμισμένη γραμμική παλινδρόμηση, υπολογίζονται οι παράμετροι A & B: $Y = A * X + B$
 - $Av Xi < 3$ μονάδες OD, τότε υπολογισθέν $X = Xi$
 - $Av Xi > 3$ μονάδες OD, τότε υπολογισθέν $X = (Yi-B)/A$
 - Χρησιμοποιείται προσαρμογή λογιστικής καμπύλης 4 παραμέτρων για τη δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης.
 - Η συγκέντρωση IL-6 στα δείγματα καθορίζεται μέσω αναγωγής στην καμπύλη βαθμονόμησης.

B. Διχρωματική ανάγνωση

1. Κάντε ανάγνωση της πλάκας στα 450 nm έναντι ενός φίλτρου αναφοράς που ρυθμίζεται στα 650 nm (ή τα 630 nm).
2. Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
3. παραστήστε γραφικά τις τιμές OD (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της IL-6 (τεταγμένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή
4. Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε ορό ελέγχου και δείγμα με αναγωγή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
5. Αναγωγή δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

IL-6-ELISA		Μονάδες OD Πολυχρωματικό μοντέλο
Βαθμονομητής	0 pg/ml 23,3 pg/ml 68 pg/ml 201 pg/ml 633 pg/ml 2560 pg/ml	79 125 193 408 1036 3579

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

Μετρήθηκαν είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεων OD σε μηδενική δέσμευση, ήταν 2 pg/ml.

B. Ειδικότητα

Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διασταύρωσην αντίδραση παρουσία 50 ng of IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN-α, IFN-γ, LIF, MIP-1α, MIP-1β, MCP-1, OSM, RANTES, TGF-β, TNF-α and TNF-β. Ελάχιστη δισταύρωσην αντίδραση (0,06%) παρατηρείται με τον παράγοντα G-CSF.

Επίδραση των διαλυτών υποδοχέων (sIL6R και sgp-130)

Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διασταύρωσην αντίδραση παρουσία 100 ng του υποδοχέα sIL6 και του υποδοχέα sgp-130.

IL6 συγκ. (pg/ml)	IL6 μετρηθείσα με 100 ng/ml του sIL6R (pg/ml)	IL6 μετρηθείσα με 100 ng/ml του sgp-130 (pg/ml)
7,5	4,3	8,3
74,0	81,8	76,0
678,0	734,0	671,0

Δεν ανιχνεύθηκαν επιδράσεις

Γ. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Ορός	N	$\text{} \pm \text{T.A.}$ (pg/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	$\text{} \pm \text{T.A.}$ (pg/ml)	Σ.Δ. (%)
A	20	147 ± 6,1	4,2	A	20	114 ± 5	4,4
B	20	623 ± 27	4,3	B	20	270 ± 15	5,4

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

Δ. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Δείγμα	Προστεθίσα IL-6 (pg/ml)	Ανακτηθείσα IL-6 (pg/ml)	Ανάκτηση (%)
Ορός 1	1066 547 228	1035 541 234	97,1 98,9 102,6
Ορός 2	1066 547 228	1110 531 250	104,1 97,1 109,6

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (pg/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (pg/ml)
Ορός	1/1 1/2 1/4 1/8 1/16 1/32	- 483 241,5 120,8 60,4 30	966 478 247 130 54 23

Τα δείγματα αραιώθηκαν με το διάλυμα αραίωσης δειγμάτων.

E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν αξιόπιστα ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 30 λεπτά μετά την προσθήκη των βαθμονομητών στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ

Δείγμα	0 λεπτά	10 λεπτά	20 λεπτά	30 λεπτά	40 λεπτά
1	61	53	56	61	76
2	196	179	205	213	273
3	1584	1478	1433	1418	1533

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης. Οροί ελέγχου που περιέχουν α'ίδιο θα επιδράσουν στην ενζυμική αντίδραση και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.
- Συνιστάται οι οροί ελέγχου να υποβάλλονται σε προσδιορισμό τακτικά ως άγνωστα δείγματα για να μετράται η μεταβλητότητα του προσδιορισμού. Η απόδοση του προσδιορισμού πρέπει να παρακολουθείται με διαγράμματα ποιοτικού ελέγχου των ορών ελέγχου.
- Είναι καλό το να ελέγχετε οπτικά την προσαρμογή της καμπύλης που επιλέχθηκε από τον υπολογιστή.

XV. TIMEΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές αντές παρέχονται μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.

Τα παρακάτω αποτελέσματα παρέχονται μόνον ως οδηγός: τα αποτελέσματα 34 δειγμάτων ορού εμφανώς υγιών απόμονω με χαμηλά επίπεδα CRP, κυμάνθηκαν μεταξύ 0 και 50 pg/ml. 31 δείγματα έλαβαν τιμές κάτω από 17 pg/ml.

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφαλείας

Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο κιτ αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Αποφέρετε την άμεση επαφή του δέρματος με όλα τα αντιδραστήρια: το ανασχετικό διάλυμα περιέχει HCl. Σε περίπτωση επαφής, πλύνετε σχολαστικά με νερό.

Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης.

Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στο Φύλλο δεδομένων ασφαλείας υλικού (MSDS).

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. HOUSSIAU F.A. et al., (1988) **IL-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides.** Arth. Rheum., 31:784-788.
2. MOSCOVITZ H. et al., (1994) **Plasma cytokine determination in emergency department patients as predictor of bacteremia and infectious disease severity.** Critical care Medicine, 22:1102-1107.
3. SAKAMOTO K. et al., (1994) **Elevation of circulating interleukin 6 after surgery : factors influencing the serum level.** Cytokine, 6:181-186.
4. KITA Y. et al., (1994) **Evaluation of sequential serum interleukin-6 levels in liver allograft recipients.** Transplantation, 57:1037-1041.
5. LE MOINE O. et al., (1994) **Interleukin-6 : an early marker of bacterial infection in decompensated cirrhosis.** J. of Hepatology, 20:819-824

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ (μl)	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ (μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα επώσης Βαθμονομητές (0-5) Δείγματα, οροί ελέγχου	50 100 -	50 - 100
Επωάστε επί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) με συνεχή ανάδευση στις 700 rpm. Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε υποδοχής. Πλύνετε 3 φορές με 400 ml διαλύματος πλύσης και αναρροφήστε.		
Σύζευγμα αντι-IL-6-HRP Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων	100 50	100 50
Επωάστε επί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) με συνεχή ανάδευση στις 700 rpm. Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε υποδοχής. Πλύνετε 3 φορές με 400 ml διαλύματος πλύσης και αναρροφήστε.		
Χρωμογόνο διάλυμα	200	200
Επωάστε επί 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) με συνεχή ανάδευση στις 700 rpm.		
Ανασχετικό διάλυμα	100	100
Διαβάστε σε συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης και καταγράψτε την απορρόφηση κάθε υποδοχής στα 450 nm (και 490 nm) έναντι 630 (ή 650 nm)		

Η υπηρεσία οργάνων της Diasource μπορεί να σας προσφέρει τη δυνατότητα απόκτησης ενός πρωτοκόλλου προσαρμοσμένου για αυτό το κιτ που θα χρησιμοποιηθεί στην πλατφόρμα Stratec Gemini 2PS + Combo, συμπεριλαμβανομένων αρχείων ανάλυσης πρωτοκόλλου, αρχείου αντιδραστηρίου και συμβουλών για την καλή χρήση του κιτ στο όργανο.

Εάν χρειάζεστε επιπλέον πληροφορίες, επικοινωνήστε με το IVDInstrumentation@diasource.be