



IVD

CE

IL-1 β -ELISA

KAP1211

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-1 β -ELISA

I. INTENDED USE

Immunoenzymatic assay for the in vitro quantitative measurement of human Interleukin 1 β (IL-1 β) in serum and plasma.

II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name : DIAsource IL-1 β -ELISA Kit
- B. Catalogue number : KAP1211 : 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-1 (IL-1) is a key mediator of the host response to various infectious, inflammatory and immunologic challenges. Two distinct polypeptides, IL-1 α and IL-1 β , mediate IL-1 biological activities and bind to the same cell surface receptor. Both are initially synthesized as 31-kDa intracellular precursors that are subsequently found as mature proteins of 17 kDa in monocyte supernates. Membrane-bound IL-1 has also been described and may account for a part of IL-1 mediated local effects. The primary sources of IL-1 are blood monocytes and tissue macrophages. Other specialized cells such as T- and B-lymphocytes, various epithelial, endothelial and some mesenchymal cells can also produce IL-1. IL-1 β is the major form secreted by monocytes and macrophages which are believed to be the main source of circulating (plasma) IL-1. Inhibitions of IL-1 activity have been described in plasma and other biological fluids. IL-1 affects several unrelated tissues and is a main mediator of the "acute phase" inflammatory responses characterised by alterations in metabolic, endocrinologic and immunologic functions. This cytokine has an essential role in T-cell activation, providing one of the necessary signals for IL-2 (T-cell growth factor) production. It is the main mediator of inflammatory processes by acting on the nervous system (fever, sleep, anorexia), on bone marrow-derived cells (chemotaxis and/or activation of neutrophils, monocytes and lymphocytes) and on various tissues (fibroblast proliferation, resorption of cartilage and bone matrices, glial cell proliferation, stimulation of endothelial cell procoagulant activity, etc.). Most of these activities are directly attributable to IL-1 β , but others are mediated in collaboration with other cytokines such as IL-6, interferons, and tumor necrosis factor. IL-1 stimulates the production or acts synergistically with these cytokines and the final biological activity is thus the result of a network of interactions between these various mediators.

B. Clinical application

The biological properties of IL-1 β and its key role in inflammatory processes suggest its involvement in the pathogenesis of many diseases. Indeed, high amounts of IL-1 are found in the joint effusions of some patients with rheumatoid and non-rheumatoid inflammatory joint diseases, in infectious pleural or peritoneal fluids, and in the drainage fluid of patients undergoing chronic diabetes, periodontal diseases, etc. Although little or no IL-1 β is normally detected in human plasma or serum obtained from healthy, rested human subjects, elevated levels have been reported in the circulation of febrile or septic patients, in patients with Crohn's disease, during graft rejection, in healthy volunteers after extended exercise and in women following ovulation. Studies based on in vitro production of IL-1 by isolated blood leukocytes have demonstrated reduced IL-1 production in malnourished patients and cancer patients with large tumor burdens. Hence, this immunoassay for IL-1 β is an important tool to study macrophage activation and to investigate the role of IL-1 β in various (physiological or pathological) immune and inflammatory processes.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DiaSource IL-1 β -ELISA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on microtiterplate. The assay uses monoclonal antibodies (MAbs) directed against distinct epitopes of IL-1 β . 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-1 β – 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-1 β concentration.

A calibration curve is plotted and IL-1 β 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
ML Microtiterplate with 96 anti IL-1 β (monoclonal antibodies) coated wells	96 wells	blue	Ready for use
Ab HRP Conjugate: HRP labelled anti-IL-1 β (monoclonal antibodies) in TRIS-Maleatel buffer with bovine serum albumin and thymol	1 vial 6 ml	red	Ready for use
CAL N Calibrator N = 0 to 5 (see exact values on vial labels) in human serum, benzamidin and thymol	6 vials lyophil.	yellow	Add 2 ml distilled water
DIL SPE Specimen Diluent: human serum, benzamidin and thymol	3 vials lyophil.	black	Add distilled water (see on the label for the exact volume)
WASH SOLN CONC Wash Solution (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	brown	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CONTROL N Controls - N = 1 or 2 in human serum, benzamidin and thymol	2 vials lyophil.	silver	Add 2 ml distilled water
CHROM TMB Chromogen TMB (Tetramethylbenzidine)	1 vial 25 ml	brown	Ready for use
STOP SOLN Stopping solution: HCl 1.0N	1 vial 12 ml	white	Ready for use

Note: 1. Use the specimen diluent for sample dilutions.

2. 1 pg of the calibrator preparation is equivalent to 100 MIU of the NIBSC 1st IS 86/680.

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 μ l, 200 μ l, 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 \pm 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)

VII. REAGENT PREPARATION

- A. **Calibrators**: Reconstitute the calibrators with 2 ml distilled water.
- B. **Controls**: Reconstitute the controls with 2 ml distilled water.
- C. **Specimen Diluent**: Reconstitute the 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 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 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-1 β production by blood cells and thus falsely increase plasma IL-1 β values.
- Collection tubes must be pyrogen-free. Plasma can be collected on sterile EDTA and rapidly separated after centrifugation. The use of heparin tubes is discouraged as batches of heparin are often contaminated with pyrogen.

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 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.

The Chromogenic Solution should be colourless. If a blue colour develops within a few minutes after preparation, this indicates that the reagent is unusable, and must be discarded.

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

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

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 200 µl of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
4. Pipette 50 µl of anti-IL-1β-HRP conjugate into all the wells.
5. Incubate for 2 hours at 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 200 µl of the Chromogenic Solution into each well within 15 minutes following the washing step.
9. Incubate the microtiterplate for 15 minutes at 18-25°C on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm, avoid direct sunlight.
10. Pipette 100 µl of Stop solution into each well.
11. 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 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 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:
 - $X_i = OD$ at 450 nm
 - $Y_i = OD$ at 490 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-1β 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. On semi-logarithmic or linear graph paper plot the OD values (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of IL-1β (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points by connecting the plotted points with straight lines.
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-1β-ELISA		OD units Polychromatic model
Calibrator	0 pg/ml 24 pg/ml 89 pg/ml 320 pg/ml 574 pg/ml 1166 pg/ml	0.013 0.121 0.336 1.042 1.693 2.704

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 0.35 pg/ml.

B. Specificity

No significant cross-reaction was observed in presence of 500 ng/ml of IL-1α, IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, TNF-β, IFN-β, IFN-γ, TGF-β, GM-CSF, OSM, MIP-1α, MIP-1β, LIF, MCP-1, G-CSF, RANTES. This IL-1β assay is specific for human natural and recombinant IL-1β.

C. Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	$\bar{X} \pm SD$ (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	$\bar{X} \pm SD$ (pg/ml)	CV (%)
A	10	127 ± 3	2.3	A	20	120 ± 6	4.9
B	10	733 ± 11	1.4	B	20	549 ± 14	2.5

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST			
Sample	Added IL-1β (pg/ml)	Recovered IL-1β (pg/ml)	Recovery (%)
Serum	1282	1196	93
	605	542	90
	329	314	95
	157	131	84
	72	64	89
	31	28	92
Plasma	1282	1208	94
	605	573	95
	329	321	97
	157	146	93
	72	67	92
	31	29	94

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (pg/ml)	Measured Concent. (pg/ml)
Serum	1/1	-	1197
	1/2	598	637
	1/4	299	320
	1/8	150	164
	1/16	75	86
	1/32	37	41
Plasma	1/1	-	688
	1/2	344	336
	1/4	172	172
	1/8	86	87
	1/16	43	51
	1/32	26	22
	1/64	13	9
	1/128	4	4

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				
	T0	10 min	20 min	30 min
1	1485	1575	1553	1647
2	1123	1129	1150	1228
4	592	572	595	606
5	375	391	375	375
6	1454	1429	1438	1605
500	641	583	645	658
1000	1107	1087	1158	1158
1500	1440	1261	1399	1425

F. Hook effect

A sample spiked with IL-1 β up to 1 μ g/ml gives higher OD's than the last calibrator point.

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 duplo 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 mean of 22 normal serum samples was 5.4 pg/ml (SD = 3.9), ranging between 0 pg/ml and 13.6 pg/ml. This study was performed on samples from apparently healthy persons with low CRP levels.

For guidance, the mean of 103 normal plasma was 2.6 pg/ml (SD = 5.3), ranging between 0 pg/ml and 17 pg/ml (based on 2.5% to 97.5% percentiles). This study was performed with samples collected in strict sampling condition

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.

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. OPPENHEIM J.J. and GERY I., (1982). **Interleukin-1 is more than an interleukin.** Immunology Today, 3:113-119.
2. MIZEL S.B., (1982). **Interleukin-1 and T-cell activation.** Immunol. Rev., 63:51-71.
3. DINARELLO C.A., (1984). **Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute phase response.** N. Eng. J. Med., 311:1413-1418.
4. DINARELLO C.A., (1985). **An update on human interleukin-1 : from molecular biology to clinical relevance.** J. Clin. Immunol., 5:287-297.
5. BAILLY, S. et al., (1994) **Comparative production of IL-1 β and IL-1 α by LPS-stimulated human monocytes : ELISAs measurement revisited.** Cytokine, 6:111-115.
6. DINARELLO C.A., (1988) **Biology of interleukin-1.** FASEB J., 2:108-115.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

CALIBRATORS (μ l)	SAMPLE(S) CONTROLS (μ l)	
Calibrators (0-5) Samples, Controls Anti-IL-1 β -HRP conjugate	200 - 50	- 200 50
Incubate for 2 hours at 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 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)		

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



fr

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

IL-1 β -ELISA

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage immuno-enzymatique pour la mesure quantitative *in vitro* de l'interleukine 1 β humaine (IL-1 β) dans le sérum et le plasma.

II. INFORMATIONS GENERALES

A. Nom du produit : DIAsource IL-1 β -ELISA kit

B. Numéro de catalogue : KAP1211 : 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-1 humaine (IL-1) est un médiateur-clé de la réponse de l'hôte à différentes infections, inflammations et défis immunologiques. Deux polypeptides distincts, les IL-1 α et IL-1 β , servent d'intermédiaires aux activités biologiques de l'IL-1 et se lient au même récepteur cellulaire de surface. Au départ, tous les deux sont synthétisés sous forme d'un précurseur intracellulaire de 31 kDa et se retrouvent ensuite dans le surnageant des monocytes sous forme de protéines matures de 17 kDa. De l'IL-1 liée au récepteur de membrane a été décrite et pourrait expliquer une partie des effets locaux auxquels l'IL-1 sert d'intermédiaire. Les sources primaires d'IL-1 sont les monocytes sanguins et les macrophages tissulaires. D'autres cellules spécialisées, comme les lymphocytes T et B, différentes cellules épithéliales, endothéliales et certaines cellules mésenchymateuses, peuvent également produire de l'IL-1. L'IL-1 β est la forme majeure sécrétée par les monocytes et les macrophages dont on croit qu'ils sont la source principale de l'IL-1 circulante (dans le plasma). Des inhibitions de l'activité de l'IL-1 ont été décrites dans le plasma et d'autres liquides biologiques. L'IL-1 agit sur différents tissus n'ayant aucun rapport les uns avec les autres et est le médiateur principal des réponses inflammatoires de « phase aiguë » caractérisées par des changements des fonctions métaboliques, endocrinien et immunologiques. Cette cytokine joue un rôle essentiel dans l'activation des cellules T, fournissant un des signaux nécessaires à la production de l'IL-2 (facteur de croissance des cellules T). C'est le médiateur principal des processus inflammatoires par son action sur le système nerveux (fièvre, sommeil, anorexie), sur les cellules dérivées de la moelle osseuse (chimiotactisme) et/ou activation des neutrophiles, monocytes et lymphocytes) et différents tissus (prolifération des fibroblastes, résorption du cartilage et des matrices osseuses, prolifération des cellules gliales, stimulation de l'activité procoagulante des cellules endothéliales, etc.). La plupart de ces activités sont directement imputables à l'IL-1 β , mais d'autres sont médiées en collaboration avec d'autres cytokines comme l'IL-6, les interférons et le facteur de nécrose tumorale. L'IL-1 stimule la production ou agit en synergie avec ces cytokines et l'activité finale est donc le résultat d'un réseau d'interactions entre ces différents médiateurs.

B. Application clinique

Les propriétés biologiques de l'IL-1 β et son rôle clé dans les processus inflammatoires suggèrent sa participation dans la pathogénèse de nombreuses maladies. En effet, on trouve de grandes quantités d'IL-1 dans le liquide d'épanchement articulaire de certains patients atteints de maladies articulaires inflammatoires rhumatoïdes et non rhumatoïdes, dans les liquides d'infection pleuraux et péritonéaux et dans le liquide de drainage de patients atteints de diabète chronique, de maladies parodontales, etc. Bien que peu ou pas d'IL-1 β ne soit normalement détectée dans le plasma ou le sérum humain de sujets sains et au repos, des taux élevés ont été rapportés dans la circulation de patients fébriles ou infectés, chez des patients souffrant de la maladie de Crohn, lors du rejet de greffe, chez des volontaires sains après un exercice intense et chez la femme après l'ovulation. Des études basées sur la production *in vitro* d'IL-1 par des leucocytes isolés du sang ont montré une diminution de la production d'IL-1 chez des patients souffrant de mal nutrition et des patients cancéreux avec une entreprise tumorale étendue. Cet immuno-essai pour l'IL-1 β est donc un outil important pour étudier l'activation des macrophages et investiguer le rôle de l'IL-1 β dans différents processus immunitaires et inflammatoires (physiologiques et pathologiques).

IV. PRINCIPES DU DOSAGE

Le kit DIAsource IL-1 β -ELISA est un « Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay » en phase solide effectué sur des microplaques. L'analyse utilise des anticorps monoclonaux (AcM) dirigés contre des épitopes distincts de l'IL-1 β . Les calibrateurs et les échantillons réagissent avec l'anticorps de capture monoclonal (AcM 1) recouvrant les puits et avec un anticorps monoclonal (AcM 2) marqué avec la peroxydase (HRP). Après une période d'incubation permettant la formation d'un sandwich: AcM 1 recouvert – IL-1 β – AcM 2 – HRP, la microplaquette est lavée afin d'enlever l'anticorps libre marqué enzymatiquement. L'anticorps lié marqué enzymatiquement est mesuré avec une réaction chromogénique. Une solution chromogénique (TMB – H₂O₂) est ajoutée et incubée. La réaction est arrêtée avec l'addition de Solution d'arrêt et la microplaquette est alors lue à la longueur d'onde appropriée. La quantité de remplacement de substrat est déterminée colorimétriquement par la mesure de l'absorbance, qui est proportionnelle à la concentration en IL-1 β .

Une courbe de calibration est dessinée et la concentration en IL-1 β dans les échantillons est déterminée par interpolation de la courbe de calibration. L'utilisation du lecteur ELISA (linéarité jusque 3 unités de DO) et une méthode de réduction de données sophistiquée (réduction de données polychromatique) résultent en une haute sensibilité dans la portée basse et en une portée de calibration étendue.

V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	96 tests Kit	Code Couleur	Reconstitution
TL Microplaquette de titration avec 96 puits recouverts d'anti IL-1 β (anticorps monoclonal)	96 puits	bleu	Prêt à l'emploi
Ab HRP Conjugué: anti-IL-1 β marqué avec de l'HRP (anticorps monoclonal) dans un tampon TRIS-maléate avec de l'albumine bovine et du thymol	1 flacon 6 ml	Rouge	Prêt à l'emploi
CAL N Calibrateur N = 0 à 5 (cfr. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans du sérum humain avec de la benzamidine et du thymol	6 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 2 ml d'eau distillée
DIL SPE Diluant du spécimen dans du sérum humain avec de la benzamidine et du thymol	3 flacons lyophilisés	Noir	Ajouter de l'eau distillée (voir le volume exact sur l'étiquette)
WASH SOLN CONC Solution de Lavage (Tris-HCl)	1 flacon 10 ml	Brun	Diluer 200 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
CONTROL N Contrôles - N = 1 ou 2 dans du sérum humain avec de la benzamidine et du thymol	2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 2 ml d'eau distillée
CHROM TMB Chromogène TMB (Tetramethylbenzydine)	1 flacon 25 ml	Brun	Prêt à l'emploi
STOP SOLN Solution d'arrêt: HCl 1.0N	1 flacon 12 ml	Blanc	Prêt à l'emploi

Note: 1. Utiliser le Diluant du spécimen pour la dilution des échantillons.
2. 1 pg de la préparation du calibrateur est équivalent à 100 mIU du NIBSC 1st IS 86/680.

VI. MATERIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

1. Eau distillée d'une haute qualité
2. Pipettes pour distribuer: 50 μ l, 200 μ l, 1 ml et 10 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes en plastique est recommandée)
3. Agitateur vortex
4. Agitateur magnétique
5. Agitateur de microplaques horizontal capable de 700 rpm \pm 100 rpm
6. Laveur de microplaques
7. Lecteur de microplaques 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 monochromatique)

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. **Calibrateurs**: Reconstituer les calibrateurs avec 2 ml d'eau distillée.
- B. **Contrôles**: Reconstituer les contrôles avec 2 ml d'eau distillée.
- C. **Diluant du spécimen**: Reconstituer le Diluant du spécimen avec le volume d'eau distillée spécifié sur l'étiquette du flacon.
- D. **Solution de Lavage**: Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 199 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (200x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage 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 de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Des barrettes inutilisées doivent être gardées, à 2-8°C, dans un sachet cacheté contenant un dessiccatif jusqu'à la date d'expiration.
- Après reconstitution, les calibrateurs, le Diluant du spécimen et les contrôles sont stables pendant 4 jours entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquotes devront être réalisées et celles-ci seront gardées à -20°C pendant 2 mois. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage concentrée est stable à 18-25°C jusqu'à la date d'expiration.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le conjugué est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Le sérum doit être débarrassé le plus rapidement possible du caillot de globules rouges après coagulation et centrifugation. Il doit être conservé à 4°C. Si les échantillons ne sont pas tout de suite utilisés, ils doivent être conservés à -20°C, au maximum pendant 2 mois, et à -70°C pour une période plus longue (maximum un an).
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Avant l'utilisation des échantillons, ceux-ci doivent être amenés à 18-25°C. On recommande de vortexer les échantillons avant de les utiliser.
- Les conditions de la prise d'échantillon pouvant affecter les résultats, il faut prendre de strictes précautions pendant la prise d'échantillon afin d'éviter que des impuretés contenues dans le matériel de prélèvement ne stimulent la production d'IL-1 β par les cellules sanguines et ne fassent faussement augmenter les taux plasmatiques d'IL-1 β .
- Les tubes de prélèvement doivent être pyrogen-free. Le plasma peut être prélevé sur de l'EDTA stérile et rapidement séparé après centrifugation. L'utilisation de tubes héparinés n'est pas encouragée car les lots d'héparine sont souvent contaminés par des substances pyrogènes.

X. MODE OPERATOIRE

A. Notes de manipulation

- Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration.
Ne pas mélanger du matériel provenant de trousse de lots différents. Mettre tous les réactifs à 18-25°C avant utilisation.
Mélangez tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce.
Tester les calibrateurs, les contrôles et les échantillons en double. Un alignement vertical est recommandé.

Utiliser un récipient en plastique propre pour préparer la Solution de Lavage.

Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon.

Pour la distribution de la Solution Chromogénique et de la Solution d'arrêt, éviter des pipettes avec des parties en métal.

Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision.

Respecter les temps d'incubation.

Afin d'éviter des anomalies, le délai entre le pipetage du premier calibrateur et celui du dernier échantillon doit être limité au délai indiqué à la section XIII paragraphe E (Délai).

Préparer une courbe d'étalonnage pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

Distribuer la Solution Chromogénique dans les 15 minutes après le lavage de la microplaqué de titration.

Eviter l'exposition à la lumière du soleil lors de l'incubation avec la Solution Chromogénique.

B. Mode opératoire

1. Sélectionner le nombre de barrettes nécessaires pour le test. Les barrettes inutilisées doivent être cachetées de nouveau dans le sachet avec un dessicant et gardées à 2-8°C.
2. Placer les barrettes dans le support.
3. Pipeter 200 µl de chaque Calibrateur, Contrôle et Echantillon dans les puits appropriés.
4. Pipeter 50 µl du conjugué anti-IL-1β-HRP dans tous les puits.
5. Incuber pendant 2 heures à 18-25°C dans un agitateur horizontal mis à 700 rpm ± 100 rpm.
6. Aspirer le liquide de chaque puits.
7. Laver la plaque 3 fois en:
 - distribuant 0,4 ml de la Solution de Lavage dans chaque puits
 - aspirant le contenu de chaque puits
8. Pipeter 200 µl de la Solution Chromogénique dans chaque puits dans les 15 minutes après la phase de lavage.
9. Incuber la microplaqué pendant 15 minutes à 18-25°C dans un agitateur horizontal mis à 700 rpm ± 100 rpm, éviter exposition à la lumière du soleil.
10. Pipeter 100 µl de la Solution d'arrêt dans chaque puits.
11. Lire les absorbances à 450 nm et 490 nm (filtre de référence 630 nm ou 650 nm) dans 3 heures et calculer les résultats comme décrits dans la section XI.

XI. CALCUL DES RESULTATS

A. Lecture polychromatique:

1. En ce cas, le software fera le traitement des données.
2. La plaque est lue d'abord à 450 nm contre un filtre de référence mis à 650 nm (ou 630 nm).
3. Une seconde lecture est effectuée à 490 nm contre le même filtre de référence.
4. Le software manœuvrera le lecteur automatiquement et intégrera les deux lectures dans un modèle polychromatique. Cette technique peut générer des DO jusqu'à 10.
5. Le principe du traitement de données polychromatique est le suivant:
 - $X_i = DO \text{ à } 450 \text{ nm}$
 - $Y_i = DO \text{ à } 490 \text{ nm}$
 - Utilisant une régression linéaire non pondérée standard, les paramètres A & B sont calculés : $Y = A*X + B$
 - Si $X_i < 3$ unités DO, X calculé = X_i
 - Si $X_i > 3$ unités DO, X calculé = $(Y_i - B)/A$
 - Un lissage de courbes « 4 paramètres » est utilisé pour la courbe de calibration.
 - La concentration en IL-1β des échantillons est déterminée par interpolation sur la courbe de calibration.

B. Lecture bichromatique

1. Lire la plaque à 450 nm contre un filtre de référence mis à 650 nm (ou 630 nm).
2. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
3. Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les DO (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en IL-1β (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l'aide des points de calibration, en connectant les points avec des lignes droites.
4. Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.
5. L'analyse informatique des données simplifiera les calculs. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.

XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont fournies pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe d'étalonnage.

IL-1β-ELISA		Unités DO modèle polychromatique
Calibrateur	0 pg/ml 24 pg/ml 89 pg/ml 320 pg/ml 574 pg/ml 1166 pg/ml	0,013 0,121 0,336 1,042 1,693 2,704

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES

A. Sensibilité

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne DO déterminée à la fixation zéro, était de 0,35 pg/ml.

B. Spécificité

On n'a pas constaté de réaction croisée significative en présence de 500 ng d'IL-1α, IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, TNF-β, IFN-β, IFN-γ, TGF-β, GM-CSF, OSM, MIP-1α, MIP-1β, LIF, MCP-1, G-CSF et RANTES. Ce dosage de l'IL-1β est spécifique de l'IL-1β humaine naturelle et recombinante.

C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	$\bar{X} \pm SD$ (pg/ml)	CV (%)	Sérum	N	$\bar{X} \pm SD$ (pg/ml)	CV (%)
A	10	127 ± 3	2,3	A	20	120 ± 6	4,9
B	10	733 ± 11	1,4	B	20	549 ± 14	2,5

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE RECUPERATION

Echantillon	IL-1β ajoutée (pg/ml)	IL-1β récupérée (pg/ml)	Récupération (%)
Sérum	1282	1196	93
	605	542	90
	329	314	95
	157	131	84
	72	64	89
	31	28	92
Plasma	1282	1208	94
	605	573	95
	329	321	97
	157	146	93
	72	67	92
	31	29	94

TEST DE DILUTION

Echantillon	Dilution	Concent. théorique (pg/ml)	Concent. Mesurée pg/ml)
Sérum	1/1	-	1197
	1/2	598	637
	1/4	299	320
	1/8	150	164
	1/16	75	86
	1/32	37	41
Plasma	1/1	-	688
	1/2	344	336
	1/4	172	172
	1/8	86	87
	1/16	43	51
	1/32	26	22
	1/64	13	9
	1/128	4	4

Les échantillons ont été dilués avec le Diluant du spécimen.

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

Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 30 minutes après que le calibrateur ait été ajouté aux puits.

	DELAI			
	T0	10 min	20 min	30 min
1	1485	1575	1553	1647
2	1123	1129	1150	1228
4	592	572	595	606
5	375	391	375	375
6	1454	1429	1438	1605
500	641	583	645	658
1000	1107	1087	1158	1158
1500	1440	1261	1399	1425

F. Effet crochet

Un échantillon dopé avec de l'IL-1 β jusqu'à 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ donne des DO supérieurs au dernier point de calibration.

XIV. CONTROLE DE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés. Des contrôles qui contiennent de l'azoture influenceront la réaction enzymatique et ne peuvent pas être utilisés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en double des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.
- On recommande que les contrôles soient testés de façon routinière comme des échantillons inconnus pour mesurer la variabilité du test. La réalisation du test doit être suivie avec des fichiers de contrôle de qualité des contrôles.
- On recommande de vérifier visuellement le lissage de la courbe sélectionnée par l'ordinateur.

XV. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont données à titre d'information; chaque laboratoire doit établir ses propres fourchettes de valeurs normales.

A titre indicatif, la moyenne de 22 sérum normaux était de 5,4 pg/ml (SD = 3,9) et la fourchette des valeurs se situait entre 0 pg/ml et 13,6 pg/ml. Cette étude a été réalisée sur des échantillons provenant de personnes en bonne santé apparente, avec de faibles teneurs en CRP.

La moyenne de 103 plasma normaux, prélevés dans de strictes conditions de prélèvement, était de 2,6/ml (SD = 5,3) et la fourchette des valeurs se situait entre 0 pg/ml et 17 pg/ml (basée sur les percentiles de 2,5% & 97,5%).

XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devra être conforme aux procédures locales de sécurité.

Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

Eviter le contact de la peau avec tous les réactifs. La Solution d'arrêt contient de l'HCl. En cas de contact, laver avec beaucoup d'eau.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

- OPPENHEIM J.J. and GERY I., (1982). **Interleukin-1 is more than an interleukin.** Immunology Today, 3:113-119.
- MIZEL S.B., (1982). **Interleukin-1 and T-cell activation.** Immunol. Rev., 63:51-71.
- DINARELLO C.A., (1984). **Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute phase response.** N. Eng. J. Med., 311:1413-1418.
- DINARELLO C.A., (1985). **An update on human interleukin-1 : from molecular biology to clinical relevance.** J. Clin. Immunol., 5:287-297.
- BAILLY, S. et al., (1994) **Comparative production of IL-1 β and IL-1 α by LPS-stimulated human monocytes : ELISAs measurement revisited.** Cytokine, 6:111-115.
- DINARELLO C.A., (1988) **Biology of interleukin-1.** FASEB J., 2:108-115.

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

CALIBRATEURS (μl)	ECHANTILLON(S) CONTROLES (μl)	
Calibrateurs (0-5)	200	-
Echantillons, Contrôles	-	200
Conjugué Anti-IL-1 β -HRP	50	50
Incuber pendant 2 heures à 18-25°C avec agitation continue à 700 rpm. Aspirer le contenu de chaque puits. Laver 3 fois avec 400 μl de la Solution de Lavage et aspirer.		
Solution Chromogénique	200	200
Incuber pendant 15 min à 18-25°C avec agitation continue à 700 rpm.		
Solution d'arrêt	100	100
Lire sur un lecteur de microplaques et enregistrer l'absorbance de chaque puits à 450 nm (contre 630 ou 650 nm) et 490 nm (contre 630 ou 650 nm)		



de

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

IL-1 β -ELISA

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein immunenzymetrisches Assay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem Interleukin 1 β (IL-1 β) in Serum und Plasma.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

A. Handelsbezeichnung : DIAsource IL-1 β -ELISA Kit

B. Katalognummer : KAP1211 : 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

Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Biologische Aktivität

Humanes Interleukin-1 (IL-1) ist der Schlüsselmediator für die Entzündungsantwort Antwort auf unterschiedliche infektiöse, entzündliche oder immunologische Abläufe. Zwei verschiedene Polypeptide, IL-1 α und IL-1 β , sind als Mediatoren verantwortlich für die biologischen Aktivitäten von IL-1 und binden am selben Oberflächenrezeptor der Zelle. Beide sind ursprünglich synthetisiert als 31-kDa intrazelluläre Zwischenprodukte, die anschließend als reife Proteine von 17 kDa im Monozytenüberstand gefunden werden. Membrangebundenes IL-1 wurde auch so beschrieben und ist möglicherweise für einen Teil der durch IL-1 vermittelten lokalen Effekte verantwortlich. Die ursprünglichen Quellen des IL-1 sind Blutmonozyten und Gewebsmakrophagen. Andere spezialisierte Zellen wie T- und B-Lymphozyten, unterschiedliche epitheliale, endotheliale und einige mesenchymale Zellen können ebenfalls IL-1 produzieren. IL-1 β ist die Hauptform, sekretiert von Monozyten und Makrophagen, welche als Hauptquelle des zirkulierenden (Plasma) IL-1 angesehen werden. Unterdrückungen der Aktivität von IL-1 wurden bei Plasma und anderen biologischen Flüssigkeiten beschrieben. IL-1 beeinflusst verschiedene unverbundene Gewebe und ist ein Hauptvermittler der "akuten Phase" der inflammatorischen Antwort des Organismus, die charakterisiert wird durch die Veränderung der metabolischen, endokrinologischen und immunologischen Funktionen. Dieses Zytokin spielt eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der T-Zellen, indem es eines der notwendigen Signale für die Produktion von IL-2 (T-Zell-Wachstumsfaktor) induziert. Es ist der Hauptmediator entzündlicher Prozesse, indem es auf das Nervensystem (Fieber, Schlaf, Appetitlosigkeit), auf die Knochenmarkszellen (Chemotaxis, und/oder Aktivierung der Neutrophile, Monozyten und Lymphozyten) und auf verschiedene Gewebe (Proliferation des Fibroblasts, Resorption von Knorpel und Knochenkitsubstanz, Proliferation der Gliazelle, Stimulation der Prokoagulanaktivität der endothelialen Zelle etc.) einwirkt. Die meisten dieser Aktivitäten werden direkt IL-1 β zugeschrieben, aber andere werden in Zusammenarbeit mit anderen Zytokinen wie IL-6, Interferonen und dem Tumor-Nekrose-Faktor vermittelt. IL-1 stimuliert die Produktion oder wirkt synergistisch mit diesen Zytokinen, wonach die letztendliche biologische Aktivität das Resultat des Netzwerks der Interaktionen zwischen den verschiedenen Mediatoren ist.

B. Klinische Anwendung

Die biologischen Eigenschaften des IL-1 und seine Schlüsselrolle bei entzündlichen Prozessen legt seine Involvierung bei der Pathogenese vieler Krankheiten nahe. In der Tat wurden hohe Werte von IL-1 in Gelenkergüssen einiger Patienten mit rheumatischen oder nicht-rheumatischen, entzündlichen Gelenkerkrankungen, bei Infektionen pleuraler oder peritonealer Flüssigkeiten, in der Drainageflüssigkeit von Patienten, die an chronischer Diabetes leiden, bei parodontalen Erkrankungen etc. gefunden. Obgleich wenig oder kein IL-1 β in humanem Plasma oder Serum, das von gesunden, ausgeruhten menschlichen Subjekten entnommen wurde, gefunden wird, wird von erhöhten Werten im Kreislauf von fiebrigem oder septischen Patienten, Patienten mit Crohn-Krankheit, während Transplantatabstoßung, bei gesunden Freiwilligen nach schwerer körperlicher Anstrengung und bei Frauen nach dem Eisprung berichtet. Studien, die auf der *in vitro* Produktion von IL-1 mittels isolierter Blutleukozyten basieren, haben eine reduzierte Produktion von IL-1 bei schlecht ernährten Patienten und solchen, die unter großen Krebstumoren leiden, gezeigt. Daher ist dieser Immunoassay für IL-1 β ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung der Makrophagenaktivierung und zur Erforschung der Rolle des IL-1 β bei verschiedenen (physiologischen oder pathologischen) Immun- und Entzündungsprozessen.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DiaSource IL-1 β -ELISA ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay (ELISA) im Mikrotiterplattenformat. Der Assay benutzt monoklonale Antikörper (MAbs), die gegen verschiedene Epitope von IL-1 β 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-1 β - MAk 2 - MRP; nicht gebundene enzymbeschriftete Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Gebundene enzymbeschriftete Antikörper werden durch eine Farbreaktion gemessen. Farblösung (TMB - H₂O₂) wird hinzugefügt und inkubiert. Die Reaktion wird durch Hinzufügen einer Stopplösung beendet und die Mikrotiterplatte wird bei adäquater Wellenlänge ausgewertet. Die Menge an Substratsatz wird kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die proportional zur IL-1 β -Konzentration ist.

Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die IL-1 β -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	Farb-Code	Rekonstitution
 Mikrotiterplatte mit 96 anti IL-1 β -beschichtete Wells (monoklonale Antikörper)	96 Wells	Blau	gebrauchsfertig
Ab HRP Konjugat: MRP beschriftete Anti-IL-1 β (monoklonale Antikörper) in TRIS-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin und Thymol	1 Gefäß 6 ml	Rot	gebrauchsfertig
CAL N Kalibrator - N = 0 bis 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etikett) in Humanserum mit Benzamidin und Thymol	6 Gefäße lyophilisiert	Gelb	2 ml dest. Wasser zugeben
DIL SPE Probenverdünner: Humanserum mit Benzamidin und Thymol	3 Gefäße lyophilisiert	Schwarz	Dest. Wasser zugeben (das exakte Volumen bitte dem Etikett entnehmen)
WASH SOLN CONC Waschlösung (Tris-HCl)	1 Gefäß 10 ml	Braun	200 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
CONTROL N Kontrollen - N = 1 oder 2 Humanserum mit Benzamidin und Thymol	2 Gefäße lyophilisiert	Silber	2 ml dest. Wasser zugeben
CHROM TMB Chromogenes TMB (Tetramethylbenzydin)	1 Gefäß 25 ml	Braun	gebrauchsfertig
STOP SOLN Stopplösung: HCl 1,0N	1 Gefäß 12 ml	Weiß	gebrauchsfertig

Bemerkung: 1. Benutzen Sie den Probenverdünner zur Probenverdünnung.
2. 1 pg der Kalibratorzubereitung ist äquivalent zu 100 mIU des NIBSC 1st IS 86/680.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

- Hochwertiges destilliertes Wasser
- Pipetten: 50 μ l, 200 μ l, 1 ml und 10 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegplastikspitzen wird empfohlen)
- Vortex Mixer
- Magnetrührer

- Horizontaler Schüttler für Mikrotiterplatte Kap. 700 rpm \pm 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)

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 2 ml dest. Wasser.
- Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 2 ml dest. 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 dest. 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 dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2° bis 8°C gelagert werden.
- Nach der Rekonstitution sind die Kalibratoren, Probenverdünner und Kontrollen bei 2°C bis 8°C 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 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 und 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 Blutgerinnzell 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 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-1 β Produktion durch Blutzellen stimulieren und somit Plasma IL-1 β Werte fälschlich steigern könnten, zu vermeiden.
- Sammelröhrchen dürfen kein Pyrogen enthalten. Plasma kann mit sterilen EDTA gesammelt und nach der Zentrifugation schnell getrennt werden. Vom Gebrauch von Heparin-Röhrchen wird abgeraten, da Heparin-Chargen des öfteren mit Pyrogen kontaminiert sind.

X. DURCHFÜHRUNG

A. Bemerkungen zur Durchführung

- Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum.
- Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf 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 reinen Kunststoffbehälter.
- Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Verwenden Sie zur Pipettierung der Substratlösung 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 Substratlösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte.
 Während der Inkubation mit der Substratlösung ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

B. Durchführung

1. 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.
2. Befestigen Sie die Streifen im Halterrahmen.
3. Pipettieren Sie jeweils 200 µl Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Wells.
4. Pipettieren Sie 50 µl Anti-IL-1β-MRP-Konjugat in alle Wells.
5. Inkubieren Sie 2 Stunden bei 18-25°C auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm.
6. Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
7. Waschen Sie die Platte dreimal:
 - pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jeden Well
 - saugen Sie der Inhalt jedes Wells ab
8. Pipettieren Sie 200 µl der Substratlösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jeden Well.
9. Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 15 Minuten bei 18-25°C auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm; vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
10. Pipettieren Sie 100 µl der Stopplösung in jeden Well.
11. 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:

1. In diesem Fall werden die Daten durch die Software verarbeitet.
2. Die Platte wird zunächst bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) ausgewertet.
3. Eine zweite Auswertung erfolgt bei 490 nm gegen denselben Referenzfilter.
4. Die Software steuert das Lesegerät automatisch und integriert beide Auswertungen in ein polychromatisches Modell. Diese Technik kann ODs bis 10 erstellen.
5. 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: $Y = A*X + B$
 - 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-1β-Konzentration in den Proben wird durch Interpolation auf der Kalibrationskurve bestimmt.

B. Bichromatische Auswertung:

1. Werten Sie die Platte bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) aus.
2. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
3. Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration IL-1β (Abszisse) und zeichnen Sie eine Kalibrationskurve durch die Kalibrationspunkte, indem Sie die eingetragenen Punkte durch gerade Linien verbinden.
4. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Kalibrationskurve.
5. 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 können nicht als Ersatz für die Echtzeitstandardkurve verwendet werden.

IL-1β-ELISA		OD Einheiten Polychromatisches Modell
Kalibrator	0 pg/ml	0,013
	24 pg/ml	0,121
	89 pg/ml	0,336
	320 pg/ml	1,042
	574 pg/ml	1,693
	1166 pg/ml	2,704

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 0,35 pg/ml.

B. Spezifität

Es wurde keine signifikante Kreuzreaktion beobachtet beim Vorhandensein von 50 ng von IL-1α, IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, TNF-β, IFN-β, IFN-γ, TGF-β, GM-CSF, OSM, MIP-1α, MIP-1β, LIF, MCP-1, G-CSF und RANTES. Dieses IL-1β Assay ist spezifisch für humanes natürliches und rekombinantes IL-1β.

C. Präzision

INTRA ASSAY

Serum	N	$\text{\langle X \rangle \pm SD (pg/ml)}$	CV (%)	Serum	N	$\text{\langle X \rangle \pm SD (pg/ml)}$	CV (%)
A	10	127 ± 3	2,3	A	20	120 ± 6	4,9
B	10	733 ± 11	1,4	B	20	549 ± 14	2,5

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST

Probe	Zugeg. IL-1β (pg/ml)	Wiedergef. IL-1β (pg/ml)	Wiedergefunden (%)
Serum	1282	1196	93
	605	542	90
	329	314	95
	157	131	84
	72	64	89
	31	28	92
Plasma	1282	1208	94
	605	573	95
	329	321	97
	157	146	93
	72	67	92
	31	29	94

VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünn.	Theoret. Konzent. (pg/ml)	Gemess. Konzent. (pg/ml)
Serum	1/1	-	1197
	1/2	598	637
	1/4	299	320
	1/8	150	164
	1/16	75	86
	1/32	37	41
Plasma	1/1	-	688
	1/2	344	336
	1/4	172	172
	1/8	86	87
	1/16	43	51
	1/32	26	22
	1/64	13	9
	1/128	4	4

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 des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugegeben wird.

ZEITDIFFERENCE				
	T0	10 min	20 min	30 min
1	1485	1575	1553	1647
2	1123	1129	1150	1228
4	592	572	595	606
5	375	391	375	375
6	1454	1429	1438	1605
500	641	583	645	658
1000	1107	1087	1158	1158
1500	1440	1261	1399	1425

F. Hook-Effekt

Eine Probe mit IL-1 β bis zu 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ liefert höhere Messwerte als der letzte Kalibratormeßwert.

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte. Kontrollen mit erhöhten Azidkonzentrationen stören die Enzymreaktion und können nicht verwendet werden.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.
- Es wird empfohlen, Kontrollen im Assay routinemäßig wie unbekannte Proben zu behandeln, um die Assayvarianz zu messen. Die Leistung des Assay muss mit den Qualitätskontrollkarten der Kontrollen überprüft werden.
- Es hat sich bewährt, die durch den Computer ausgewählte Kurvenanpassung visuell zu überprüfen.

XV. REFERENZ INTERVALLE

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

Zur Orientierung: Der Mittelwert von 22 normalen Serumproben lag bei 5,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($SD = 3,9$), Werte zwischen 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 13,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Diese Studie wurde durchgeführt mit Proben von anscheinend gesunden Personen mit niedrigen CRP Werten.

Der Mittelwert von 103 normalen Plasmaproben, gesammelt unter strengen Sammelbedingungen lag bei 2,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($SD = 5,3$), Werte zwischen 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 17 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (auf Basis der 2,5% und 97,5% Perzentile).

XIII. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in den USA erprobten FDA-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 Kindern 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; Stopplösung 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.

XVII. LITERATUR

1. OPPENHEIM J.J. and GERY I., (1982). **Interleukin-1 is more than an interleukin.** Immunology Today, 3:113-119.
2. MIZEL S.B., (1982). **Interleukin-1 and T-cell activation.** Immunol. Rev., 63:51-71.
3. DINARELLO C.A., (1984). **Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute phase response.** N. Eng. J. Med., 311:1413-1418.
4. DINARELLO C.A., (1985). **An update on human interleukin-1 : from molecular biology to clinical relevance.** J. Clin. Immunol., 5:287-297.
5. BAILLY, S. et al., (1994) **Comparative production of IL-1 β and IL-1 α by LPS-stimulated human monocytes : ELISAs measurement revisited.** Cytokine, 6:111-115.
6. DINARELLO C.A., (1988) **Biology of interleukin-1.** FASEB J., 2:108-115.

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

KALIBRATOREN (μl)	PROBE(N) KONTROLLEN (μl)
Kalibratoren (0-5) Proben, Kontrollen Anti-IL-1 β -MRP Konjugat	200 - 50
2 Stunden bei 18-25°C unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren. Inhalt jedes Wells absaugen. Dreimal mit 400 μl Waschlösung waschen und absaugen.	
Substratlösung	200
15 min. bei 18-25°C unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren.	
Stopplösung	100
Auf einem Mikrotiterplatten-Lesegerät auswerten und Absorption jedes Wells bei 450 nm (gg. 630 oder 650 nm) und 490 nm (gg. 630 oder 650 nm) vermerken.	



el

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

IL-1 β -ELISA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ανοσοενζυμομετρικός προσδιορισμός για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης ιντερλευκίνης-1 β (IL-1 β) σε ορό και πλάσμα

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. Εμπορική ονομασία: Kit IL-1 β -ELISA της DIAsource
B. Αριθμός καταλόγου: KAP1211: 96 προσδιορισμοί
Γ. 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. ΚΑΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Βιολογική δράση

Η ανθρώπινη ιντερλευκίνη-1 (IL-1) είναι ένας μεσολαβητής-κλειδί στην αντίδραση του ξενιστή σε διάφορες λοιμώδεις, φλεγμονώδεις και ανοσολογικές προκλήσεις. Δύο διακριτά πολυπεπτίδια, η IL-1α και η IL-1 β , μεσολαβούν στις βιολογικές δράσεις της IL-1 και προσδένονται στον ίδιο κυτταρικό επιφανειακό υποδοχέα. Αμφότερες συντίθενται αρχικά ως ενδοκυττάριες πρόδρομες μορφές μεγέθους 31-kDA, οι οποίες ακολουθώς ανευρίσκονται ως ώρμες πρωτεΐνες των 17 kDA σε υπερκείμενα μονοκυττάρια. Έχει επίσης περιγραφεί η δεσμευμένη σε μεμβράνες IL-1, η οποία ενδέχεται να επάγει ορισμένες από τις μεσολαβούμενες από IL-1 τοπικές επιδράσεις. Ο κύριες πηγές της IL-1 είναι τα μονοκυττάρα του αίματος και τα μακροφάγα των ιστών. Άλλα εξειδικευμένα κύτταρα όπως τα T- και B-λεμφοκυττάρα, δάφορα επιθηλιακά, ενδοθηλιακά και ορισμένα μεσεγχυματικά κύτταρα μπορούν επίσης να παράγουν IL-1. Η IL-1 β είναι η κύρια μορφή που εκκρίνεται από τα μονοκυττάρα και τα μακροφάγα και τα οποία πιστεύεται πως αποτελούν τις κύριες πηγές της κυκλοφορούσας στο πλάσμα IL-1. Αναστολές της δραστηριότητας της IL-1 έχουν περιγραφεί στο πλάσμα και σε άλλα βιολογικά υγρά. Η IL-1 επηρεάζει αρκετούς μη σχετιζόμενους ιστούς και αποτελεί κύριο μεσολαβητή των φλεγμονώδων αντιδράσεων «οξείας φάσης», που χαρακτηρίζονται από αλλαγές των μεταβολικών, ενδοκρινολογικών και ανοσολογικών λειτουργιών. Η συγκεκριμένη κυτταροκίνη διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στην ενεργοτοίση των T-λεμφοκυττάρων, παρέχοντας ένα από τα απαραίτητα σήματα για την παραγωγή IL-2 (αυξητικός παράγοντας των T-λεμφοκυττάρων). Αποτελεί τον κύριο μεσολαβητή των διαδικασιών φλεγμονής δρώντας στο νευρικό σύστημα (πυρετός, ύπνος, ανορεξία), σε κύτταρα προερχόμενα από τον οστικό μιελό (χρημειοτάξια και/ή ενεργοτοίση ουδετερόφιλων, μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων) και σε δάφορους ιστούς (πολλαπλασιασμός ινοβλαστών, απορροφηση θεμέλιων ουσιών χόνδρων και οστών, πολλαπλασιασμός νευρογιοιακών κυττάρων, διέγερση της προπηκτικής λειτουργίας των ενδοθηλιακών κυττάρων κ.ά.). Για τις περισσότερες από αυτές τις δραστηριότητες άμεσα υπεύθυνη είναι η IL-1 β , ωστόσο άλλες μεσολαβούνται σε συνεργασία με άλλες κυτταροκίνες, όπως η IL-6, ιντερφερόνες, και ο παράγοντα νέκρωσης όγκων H IL-1 διεγίρει την παραγωγή ή δρα συνεργικά με τις παραπάνω κυτταροκίνες και συνεπώς η τελική βιολογική δραστηριότητα είναι το αποτέλεσμα ενός δικτύου αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων μεσολαβητών.

B. Κλινικές εφαρμογές

Οι βιολογικές ιδιότητες της IL-1 β και ο ρόλος-κλειδί που διαδραματίζει σε διαδικασίες φλεγμονής υποδηλώνουν την ανάμειξή της στην παθογένεση πολλών ασθενειών. Πράγματι, υψηλές ποσότητες IL-1 β ανευρίσκονται στις ενδοαρθρικές συλλογές ορισμένων ασθενών με ρευματοειδείς και μη-ρευματοειδείς φλεγμονώδεις παθήσεις των αρθρώσεων, σε λοιμώδους αιτιολογίας πλευριτικές ή περιτονάϊκες συλλογές και στα υγρά παροχετεύσεων πασχόντων από χρόνιο διαβήτη, περιοδοντικές παθήσεις, κ.ο.κ. Μολονότι ελάχιστη ή καθόλου IL-1 β ανιχνεύεται φυσιολογικά σε ανθρώπινο πλάσμα ή ορό υγιών, ζεκούραστων ανθρώπινων υποκειμένων, αυξημένα επίτειδα έχουν αναφερθεί στην κυκλοφορία εμπόρευτων ή σηπτικών ασθενών, σε ασθενείς με νόσο του Crohn, σε περιπτώσεις απόρριψης μοσχεύματος, σε υγιείς εθελοντές μετά από παρατεταμένη άσκηση και σε γυναίκες μετά την ωορρήξια. Σε μελέτες βασισμένες στην *in vitro* παραγωγή IL-1 από απομονωμένα λευκοκυττάρα του αίματος φάνηκε μειωμένη παραγωγή IL-1 σε υποστιπισμένους ασθενείς και καρκινοπαθείς με προχωρημένους όγκους. Ως εκ τούτου, αυτός ο ανοσοπροσδιορισμός της IL-1 β αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη της ενεργοτοίσης μακροφάγων και τη διερεύνηση του ρόλου της IL-1 β σε ποικίλες (φυσιολογικές ή παθολογικές) ανοσολογικές και φλεγμονώδεις διαδικασίες.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο προσδιορισμός IL-1β-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-1β. Οι βαθμονομητές και τα δείγματα αντιδρούν με το μονοκλωνικό αντίσωμα σύλληψης (MAb 1) που είναι επιστρώμενο στην υποδοχή της πλάκας μικροτιτλοδότησης και με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα (MAb 2) σημασμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP). Μετά από μια περίοδο επώασης που επιτρέπει το σχηματισμό ενός σάντουιτς: επιστρώμενο MAb 1 – ανθρώπινη IL-1β – MAb 2 – HRP, η πλάκα μικροτιτλοδότησης υποβάλλεται σε πλύση για να απομακρυνθεί το σημασμένο με ένζυμο αδέσμευτο αντίσωμα. Το σημασμένο με ένζυμο δεσμευμένο αντίσωμα μετράται μέσω μιας χρωμογόνου αντιδρασης. Προστίθεται και εποιάζεται χρωμογόνο διάλυμα (TMB έτοιμο για χρήση). Η αντιδραση 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-1β.

Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζεται η συγκέντρωση της IL-1β στα δείγματα με αναγωγή από την καμπύλη βαθμονόμησης. Η χρήση του συστήματος ανάγνωσης ELISA (γραμμικότητα έως 3 μονάδες OD) και μιας πολύπλοκης μεθόδου αναγωγής δεδουλεύνων (αναγωγή πολυχρωματικών δεδομένων) έχουν ως αποτέλεσμα υψηλή ευαισθησία στο χαμηλό πεδίο τιμών και στο εκτεταμένο πεδίο τιμών βαθμονόμησης.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 προσδιορισμών	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση
ΠΛ Πλάκα μικροτιτλοδότησης με 96 υποδοχές επιστρώματος με αντί IL-1β (μονοκλωνικά αντισώματα)	96 υποδοχές	μπλε	Έτοιμο για χρήση
Ab HRP Σύνεγμα: Αντί-IL-1β (μονοκλωνικά αντισώματα) σημασμένα με HRP σε ριθμιστικό διάλυμα Tris-μηλικών με βόεια ορολευκωματίνη και θυμόλη	1 φιαλίδιο 6 ml	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
CAL N Βαθμονομητής N = 0 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο ορό με βενζαμιδίνη και θυμόλη	6 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε 2 ml απεσταγμένου νερού
DIL SPE Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων: σε ανθρώπινο ορό με βενζαμιδίνη και θυμόλη	3 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	μαύρο	Προσθέστε απεσταγμένο νερό (βλ. ετικέτα στο φιαλίδιο για τον ακριβή όγκο)
WASH SOLN CONC Διάλυμα πλύσης (Tris-HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 200 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
CONTROL N Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο ορό με βενζαμιδίνη και θυμόλη	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	ασημί	Προσθέστε 2 ml απεσταγμένου νερού
CHROM TMB Χρωμογόνο TMB (Τετραμεθυλβενζιδίνη)	1 φιαλίδιο 25 ml	καφέ	Έτοιμο για χρήση
STOP SOLN Ανασχετικό διάλυμα: HCl 1.0N	1 φιαλίδιο 12 ml	πράσινο	Έτοιμο για χρήση

Σημείωση: 1. Χρησιμοποιήστε διάλυμα αραίωσης δειγμάτων για αραίωση των δειγμάτων.

2. 1 pg του παρασκευάσματος του βαθμονομητή είναι ισοδύναμο με 100 mIU του NIBSC 1° IS 86/504

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

- Απεσταγμένο νερό υψηλής ποιότητας
- Πιπέτες για διανομή: 50 μl, 200 μl, 1 ml και 10 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
- Αναμεύκτης στροβιλισμού
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Οριζόντια συσκευή αναδέυσης πλακών μικροτιτλοδότησης με δυνατότητα 700 rpm ± 100 rpm
- Συσκευή πλύσης για πλάκες μικροτιτλοδότησης
- 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)

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε τους βαθμονομητές με 2,0 ml απεσταγμένου νερού.
- Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 2,0 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 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 τανίνες πρέπει να φυλάσσονται στους 2-8°C, σε σφραγισμένη σακούλα που περιέχει αποξηραντικό παράγοντα, μέχρι την ημερομηνία λήξης.
- Μετά την ανασύσταση, οι βαθμονομητές, οι οροί ελέγχου και το διάλυμα αραίωσης δειγμάτων σταθερά επί 4 ημέρες στους 2-8°C. Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, θα πρέπει να δημιουργηθούν κλάσματα/δόσεις μίας χρήσης και να διατηρηθούν σε θερμοκρασία -20°C επί 2 μήνες το μέγιστο. Αποφύγετε τους επανειλημμένους κύκλους αποψυξης-κατάψυξης.
- Το συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης είναι σταθερό σε 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, ερμητικό 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 ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Ο ορός θα πρέπει να αφαιρεθεί όσο το δυνατόν νωρίτερα από το πήγμα των ερυθροκυττάρων μετά την πήξη και τη φυγοκέντριση και να διατηρηθεί στους 4°C. Εάν τα δείγματα δεν χρησιμοποιηθούν αμέσως, θα πρέπει να φυλαχθούν στους -20°C για έως και 2 μήνες ή στους -70°C για μεγαλύτερης διάρκειας φύλαξη (έως ένα έτος).
- Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Φέρετε όλα τα δείγματα σε 18-25°C πριν από τη χρήση. Συνιστάται η αναμεύξη των δειγμάτων σε συσκευή στροβιλισμού πριν από τη χρήση.
- Οι συνήθειες 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-1β από αιμοκύτταρα και θα αύξαναν εσφαλμένα τις τιμές της IL-1β στον ορό.
- Τα σωληνάρια συλλογής θα πρέπει να είναι ελεύθερα πυρογενών. Το πλάσμα μπορεί να συλλέγεται σε αποστειρωμένα φιαλίδια με EDTA και να διαχωρίζεται ταχέως μετά τη φυγοκέντριση. Δεν συνιστάται η χρήση σωληναρίων ηπαρίνης, διότι συχνά οι παρτίδες ηπαρίνης είναι επιμολύσμενες με πυρετογόνα.

X. ΑΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

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 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 πλύσης.
Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση.
Αποφύγετε πιπέτες με μεταλλικά μέρη για τη διανομή του Αποκαλυπτικού Διαλύματος και του Ανασχετικού Διαλύματος.
Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου 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.

Το Αποκαλυπτικό Διαλύμα θα πρέπει να είναι άχρωμο. Η δημιουργία μπλε χρωματισμού σε διάστημα λίγων λεπτών από την πρετοιμασία υποδεικνύει πως το αντιδραστήριο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί και θα πρέπει να απορριφθεί.

Διανείμετε το Αποκαλυπτικό Διαλύμα εντός 15 λεπτών, μετά την πλύση της πλάκας μικροτιτλοδότησης.

Κατά τη διάρκεια επώασης με το Αποκαλυπτικό Διαλύμα, αποφύγετε την έκθεση της πλάκας μικροτιτλοδότησης στο άμεσο ηλιακό φως.

B. Διαδικασία

- Επιλέξτε τον απαιτούμενο αριθμό ταινιών για την ανάλυση. Οι μη χρησιμοποιημένες ταινίες πρέπει να ξανασφραγιστούν μέσα στη σακούλα με τον αποξηραντικό παράγοντα και να φυλαχτούν σε θερμοκρασία 2-8°C.
- Ασφαλίστε τις ταινίες μέσα στο πλαστικό στήριξης.
- Διανείμετε με πιπέτα 200 μl από κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα στις κατάλληλες υποδοχές.
- Διανείμετε με πιπέτα 50 μl συζεύγματος αντι-IL-1β μέσα σε όλες τις υποδοχές.
- Επωάστε επί 2 ώρες σε 18-25°C επάνω σε οριζόντιο αναδευτήρα, ρυθμισμένο στις 700 rpm ± 100 rpm.
- Αναρροφήστε τη συρόμενη υποδοχή.
- Πλύνετε την πλάκα 3 φορές:
 - διανέμοντας 0,4 ml διαλύματος πλύσης σε κάθε υποδοχή.
 - αναρροφώντας το περιεχόμενο κάθε υποδοχής.
- Διανείμετε με πιπέτα 200 μl του Αποκαλυπτικού διαλύματος σε κάθε υποδοχή, εντός 15 λεπτών από το βήμα πλύσης.
- Επωάστε την πλάκα μικροτιτλοδότησης επί 15 λεπτά σε 18-25°C σε οριζόντιο αναδευτήρα στις 700 rpm ± 100 rpm, αποφύγετε την άμεση έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία.
- Διανείμετε με πιπέτα 100 μl ανασχετικού διαλύματος σε κάθε υποδοχή.
- Κάντε ανάγνωση των απορροφήσεων στα 450 nm και 490 nm (φίλτρο αναφοράς 630 nm ή 650 nm) εντός 3 ωρών και υπολογίστε τα αποτελέσματα όπως περιγράφεται στην ενότητα XI.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

A. Πολυχρωματική ανάγνωση:

- Στην περίπτωση αυτή, την επεξεργασία των δεδομένων θα κάνει το λογισμικό του.
- Η ανάγνωση της πλάκας γίνεται πρώτα στα 450 nm έναντι ενός φίλτρου αναφοράς που ρυθμίζεται στα 650 nm (ή τα 630 nm).
- Εκτελέσται δεύτερη ανάγνωση στα 490 nm έναντι του ίδιου φίλτρου αναφοράς.
- Το λογισμικό του 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.
- βασική αρχή της επεξεργασίας των πολυχρωματικών δεδομένων έχει ωεξής:
 - 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-1β στα δείγματα καθορίζεται μέσω αναγωγής στην καμπύλη βαθμονόμησης.

B. Διγραμματική ανάγνωση

- Κάντε ανάγνωση της πλάκας στα 450 nm έναντι ενός φίλτρου αναφοράς που ρυθμίζεται στα 650 nm (ή τα 630 nm).
- Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- Σε ημιλογαριθμικό ή γραμμικό χαρτί γραφημάτων, παραστήστε γραφικά τις τιμές OD (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της IL-1β (τετμημένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, συνδέοντας με ευθείες γραμμές τα αποτυπωμένα σημεία.
- Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε ορό ελέγχου και δείγμα με αναγωγή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
- 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-1β-ELISA		Μονάδες OD Πολυχρωματικό μοντέλο
Βαθμονομητής	0 pg/ml 24 pg/ml 89 pg/ml 320 pg/ml 574 pg/ml 1166 pg/ml	0,013 0,121 0,336 1,042 1,693 2,704

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

Μετρήθηκαν είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, ορίζομενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεις OD σε μηδενική δέσμευση, ήταν 0,35 pg/ml.

B. Ειδικότητα

Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διασταυρούμενη αντίδραση παρουσία 500 ng/ml IL-1α, IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, TNF-β, IFN-β, IFN-γ, TGF-β, GM-CSF, OSM, MIP-1α, MIP-1β, LIF, MCP-1, G-CSF, RANTES. Ο παρών προσδιορισμός IL-1β είναι ειδικός για την ανθρώπινη, φυσική και ανασυνδυασμένη IL-1β.

C. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Ορός	N	$\langle X \rangle \pm T.A$ (pg/ml)	Σ.Δ (%)	Ορός	N	$\langle X \rangle \pm T.A$ (pg/ml)	Σ.Δ (%)
A	10	127 ± 3	2,3	A	20	120 ± 6	4,9
B	10	733 ± 11	1,4	B	20	549 ± 14	2,5

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

D. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Δείγμα	Προστεθείσα IL-1β (pg/ml)	Ανακτηθείσα IL-1β (pg/ml)	Ανάκτηση (%)
Ορός	1282	1196	93
	605	542	90
	329	314	95
	157	131	84
	72	64	89
	31	28	92
Πλάσμα	1282	1208	94
	605	573	95
	329	321	97
	157	146	93
	72	67	92
	31	29	94

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (pg/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (pg/ml)
Ορός	1/1	-	1197
	1/2	598	637
	1/4	299	320
	1/8	150	164
	1/16	75	86
	1/32	37	41
Πλάσμα	1/1	-	688
	1/2	344	336
	1/4	172	172
	1/8	86	87
	1/16	43	51
	1/32	26	22
	1/64	13	9
	1/128	4	4

Τα δείγματα αραιώθηκαν με διάλυμα αραίωσης δειγμάτων.

E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και ² δείγματος

Οπως 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.

ΧΡΟΝΙΚΗ ΚΑΘΥΣΤΕΡΗΣΗ				
	T0	10 λεπτά	20 λεπτά	30 λεπτά
1	1485	1575	1553	1647
2	1123	1129	1150	1228
4	592	572	595	606
5	375	391	375	375
6	1454	1429	1438	1605
500	641	583	645	658
1000	1107	1087	1158	1158
1500	1440	1261	1399	1425

F. Φαινόμενο αγκίστρου (hook)

Δείγμα που εμβολιάστηκε με IL-1β έως 1 μg/ml δίνει υψηλότερες μετρήσεις οπτικής πυκνότητας (OD) από το σημείο του τελευταίου βαθμονομητή.

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 φιαλίδιου, 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 κατευνηγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης. Οροί ελέγχου που περιέχουν αζίδιο 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 αυτές παρέχονται μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.

Ως καθοδήγηση, ο μέσος όρος 22 φυσιολογικών δειγμάτων πλάσματος ήταν 5,4 pg/ml (T.A. = 3,9) με διακύμανση μεταξύ 0 pg/ml και 13,6 pg/ml. Η μελέτη διενεργήθηκε με δείγματα από εμφανώς υγιή άτομα με χαμηλά επίπεδα CRP. Για λόγους καθοδήγησης, ο μέσος όρος 103 φυσιολογικών δειγμάτων πλάσματος ήταν 2,6 pg/ml (T.A. = 5,3), με διακύμανση μεταξύ 0 pg/ml και 17 pg/ml (με

βάση τα εκατοστημόρια 2,5% έως 97,5%) Η μελέτη διενεργήθηκε με δείγματα που λήφθηκαν υπό αυστηρές συνθήκες δειγματοληψίας.

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Aσφαλείας

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 παρονούσια 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.

Αποφύγετε κάθε επαφή με το δέρμα με όλα τα αντιδραστήρια. Το Ανασχετικό Διάλυμα περιέχει HCl. Σε περίπτωση επαφής, πλύνετε σχολαστικά με νερό.

Μην καντινέζετε, 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.

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- OPPENHEIM J.J. and GERY I., (1982). **Interleukin-1 is more than an interleukin.** Immunology Today, 3:113-119.
- MIZEL S.B., (1982). **Interleukin-1 and T-cell activation.** Immunol. Rev., 63:51-71.
- DINARELLO C.A., (1984). **Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute phase response.** N. Eng. J. Med., 311:1413-1418.
- DINARELLO C.A., (1985). **An update on human interleukin-1 : from molecular biology to clinical relevance.** J. Clin. Immunol., 5:287-297.
- BAILLY, S. et al., (1994) **Comparative production of IL-1 β and IL-1 α by LPS-stimulated human monocytes : ELISAs measurement revisited.** Cytokine, 6:111-115.
- DINARELLO C.A., (1988) **Biology of interleukin-1.** FASEB J., 2:108-115.

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ (μl)	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ (μl)
Βαθμονομητές (0-5)	200
Δείγματα, οροί ελέγχου	-
Σύζευγμα αντι-IL-1 β -HRP	200
	50
	50
Επωάστε επί 2 ώρες σε 18-25°C με συνεχή ανάδευση στις 700 rpm. Αναρρωφήστε το περιεχόμενο κάθε υποδοχής. Πλύνετε 3 φορές με 400 μl διαλύματος πλύσης και αναρροφήστε.	
Αποκαλυπτικό Διάλυμα	200
Επωάστε επί 15 λεπτά σε 18-25°C με συνεχή ανάδευση στις 700 rpm.	
Ανασχετικό διάλυμα	100
Διαβάστε σε συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης και καταγράψτε την απορρόφηση κάθε υποδοχής στα 450 nm (και 490 nm) έναντι 630 (ή 650 nm)	



pt

Leia todo o protocolo antes de usar.

IL-1 β -ELISA

I. USO PREVISTO

Ensaio imunoenzimático para doseamento quantitativo in vitro da Interleucina 1 β (IL-1 β) humana em soro e plasma.

II. INFORMAÇÕES GERAIS

- A. **Nome proprietário:** Kit DIAsource IL-1 β -ELISA
B. **Número de catálogo:** KAP1211: 96 testes
C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays SA
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

**Para assistência técnica ou informações sobre pedidos,
contate: Tel: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.91**

III. CONTEXTO CLÍNICO

A. Atividade biológica

A interleucina -1 humana (IL -1) desempenha um papel importante na resposta do hospedeiro a vários processos infeciosos, inflamatórios e imunológicos. Dois polipeptídeos distintos, IL-1 α e IL-1 β , medeiam as atividades biológicas da IL-1 e ligam-se à mesma célula recetor de superfície. Ambos são inicialmente sintetizados como precursores intracelulares de 31 kDa que são subsequentemente encontrados como proteínas maduras de 17 kDa em sobrenadantes de monócitos. A IL-1 ligada à membrana, também foi descrita e pode ser responsável por uma parte dos efeitos locais mediados por IL-1. As fontes primárias de IL-1 são monócitos sanguíneos e macrófagos teciduais. Outras células especializadas, como linfócitos T e B, várias células epiteliais, endoteliais e algumas células mesenquimais também podem produzir IL-1. A IL-1 β é a principal forma secretada por monócitos e macrófagos que se acredita serem a principal fonte de IL-1 circulante (plasmática). Foram descritas inibições da atividade da IL-1 no plasma e em outros fluidos biológicos. A IL-1 afeta vários tecidos não relacionados e é o principal mediador das respostas inflamatórias da "fase aguda" caracterizada por alterações nas funções metabólicas, endocrinológicas e imunológicas. Essa citocina tem papel essencial na ativação das células T, fornecendo um dos sinais necessários para a produção de IL-2 (fator de crescimento de células T). É o principal mediador dos processos inflamatórios, atuando no sistema nervoso (febre, sono, anorexia), nas células derivadas da medula óssea (quimiotaxia e/ou ativação de neutrófilos, monócitos e linfócitos) e em vários tecidos (proliferação de fibroblastos, reabsorção de cartilagem e matrizes ósseas, proliferação de células gliais, estimulação da atividade pró-coagulante das células endoteliais, etc.). A maioria dessas atividades são diretamente atribuídas à IL-1 β , mas outras são mediadas em colaboração com outras citocinas, como IL-6, interferons e fator de necrose tumoral. A IL-1 estimula a produção ou atua sinergicamente com essas citocinas e a atividade biológica final é, portanto, resultado de uma rede de interações entre esses vários mediadores.

B. Aplicação clínica

As propriedades biológicas da IL-1 β e seu papel fundamental nos processos inflamatórios sugerem seu envolvimento na patogénese de muitas doenças. De facto, altas quantidades de IL-1 são encontradas nos derrames articulares de alguns pacientes com doenças articulares inflamatórias reumatóides e não reumatóides, em fluidos pleurais ou peritoneais infeciosos e no fluido de drenagem de pacientes com diabetes crónica, doenças periodontais, etc. Embora pouca ou nenhuma IL-1 β seja normalmente detetada no plasma ou soro humano de indivíduos saudáveis, em repouso. No entanto, foram encontrados níveis elevados na circulação de pacientes febris ou sépticos, em pacientes com doença de Crohn, durante a rejeição de enxertos, em voluntários saudáveis após exercícios prolongados e em mulheres após a ovulação. Estudos baseados na produção in vitro de IL-1 por leucócitos sanguíneos isolados demonstraram produção reduzida de IL-1 em pacientes desnutridos e pacientes com cancro com grandes cargas tumorais. Assim, este imunoensaio para IL-1 β é uma ferramenta importante para estudar a ativação de macrófagos e investigar o papel de IL-1 β em vários processos imunes e inflamatórios (fisiológicos ou patológicos).

4. PRINCÍPIO DO MÉTODO

O kit IL-1 β -ELISA DIAsource é um imunoensaio enzimático de sensibilidade amplificada em fase sólida que se realiza em microplaca. O ensaio utiliza anticorpos monoclonais (MAbs) direcionados contra epítopos distintos de IL-1 β . Os calibradores e as amostras reagem com o anticorpo monoclonal de captura (MAb1) 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 da sanduíche: MAb 1 revestido – IL-1 β humana – MAb 2 – HRP, a microplaca é lavada para remover o anticorpo marcado com enzima não ligado. O anticorpo marcado com enzima ligado é medido através de uma reação cromogénica. A solução cromogénica (TMB) é adicionada e incubada. A reação é interrompida com a adição de solução de Stop e a microplaca é então lida no comprimento de onda apropriado.

Uma curva de calibração é traçada e a concentração de IL-1 β nas amostras é determinada por interpolação da curva de calibração. O uso do leitor ELISA (linearidade de até 3 unidades OD) e um método sofisticado de redução de dados (redução policromática de dados) resulta em alta sensibilidade na faixa baixa e numa faixa de calibração estendida.

VI. MATERIAL NÃO FORNECIDO

- O seguinte material é necessário, mas não é fornecido no kit:
1. Água destilada de alta qualidade
 2. Pipetas para medição de: 50 μ L, 200 μ L, 1 mL e 10 mL (recomenda-se o uso de pipetas de alta precisão com pontas de plástico descartáveis)
 3. Agitador tipo vortex
 4. Agitador magnético
 5. Agitador horizontal de microplacas que atinja 700 rpm \pm 100 rpm
 6. Lavador de microplacas
 7. Leitor de microplacas capaz de ler em 450 nm, 490 nm e 650 nm (no caso de leitura policromática) ou capaz de ler em 450 nm e 650 nm (leitura bicromática)

VII. PREPARAÇÃO DE REAGENTES

- A. Calibradores: Reconstitua os calibradores com 2 mL de água destilada
- B. Controlos: Reconstitua os controlos com 2 mL de água destilada
- C. Diluente de amostra: Reconstitua o diluente da amostra no volume especificado no rótulo do frasco com água destilada.
- D. Solução de lavagem de trabalho: Prepare um volume adequado de solução de lavagem de trabalho adicionando 199 volumes de água destilada a 1 volume de solução de lavagem (200x). Use um agitador magnético para homogeneizar. Elimine a solução de lavagem de trabalho não utilizada no final do dia.

VIII. ARMAZENAMENTO E DATA DE VALIDADE DOS REAGENTES

- Antes da abertura ou reconstituição, todos os componentes do kit são estáveis até a data de validade indicada no rótulo do frasco, desde que mantidos entre 2 e 8°C.
- As tiras dos poços não utilizadas devem ser armazenadas, a 2-8°C, num saco selado contendo um dessecante até a data de validade.
- Após a reconstituição, os calibradores e controlos são estáveis por 4 dias entre 2 e 8°C. Para períodos de armazenamento mais longos, as alíquotas devem ser mantidas a-20°C por no máximo 2 meses.
- Evite ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento.
- A solução de lavagem concentrada é estável entre 18 e 25°C até à data de validade.
- A solução de lavagem de trabalho recém-preparada deve ser usada no mesmo dia.
- Após a primeira utilização, o conjugado é estável até ao prazo de validade, desde que mantido no frasco original bem fechado entre 2 e 8°C.
- Alterações na aparência física dos reagentes do kit podem indicar instabilidade ou deterioração.

IX. COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

- Após a formação do coágulo, a amostra deve ser centrifugada e o soro deve ser removido o mais rápido possível, e mantido a 4°C. Se as amostras não forem usadas imediatamente, devem ser congeladas a-20°C por no máximo 2 meses e a -70°C para armazenamento mais longo (máximo um ano).
- Evite ciclos repetidos de congelamento e descongelamento.
- Antes de iniciar o doseamento todas as amostras devem estar entre 18 e 25°C. Recomenda-se agitar as amostras antes do uso.
- As condições da colheita podem afetar os valores, portanto, devem ser tomadas precauções durante a colheita e preparação das amostras para evitar que as impurezas contidas nos materiais de colheita possam estimular a produção de IL-1 β pelas células sanguíneas e, assim, aumentar falsamente os valores plasmáticos de IL-1 β .
- Os tubos de colheita devem ser isentos de pirogénios. O plasma pode ser colhido em EDTA estéril e rapidamente separado após a centrifugação. O uso de tubos de heparina é desencorajado, pois os lotes de heparina estão frequentemente contaminados com pirogénio.

X. PROCEDIMENTO

A. Notas de manuseamento

Não use o kit ou componentes do mesmo fora do prazo e validade. Não misture materiais de diferentes lotes de kits.

Permita que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente (18-25°C) antes de usar. Misture bem todos os reagentes e amostras agitando ou girando suavemente.

Dosei os calibradores, controlos e amostras em duplicado. O alinhamento vertical é recomendado.

Use um recipiente de plástico limpo para preparar a solução de lavagem. Para evitar a contaminação cruzada, use uma ponta de pipeta descartável limpa para a adição de cada reagente e amostra.

Para dispensar a solução cromogénica e a solução de stop, evite usar pipetas com partes metálicas.

Pipetas de alta precisão ou equipamentos de pipetagem automatizados melhoram a precisão. Respeite os tempos de incubação.

V. REAGENTES FORNECIDOS	Reagentes	96 testes kit	Reconstituição
PL	Microplaca com 96 anti IL-1 β (anticorpos monoclonais) poços revestidos	96 poços	Pronto a usar
Ab HRP	Conjugado: anti-IL-1 β marcado com HRP (anticorpos monoclonais) em tampão TRIS-Maleat com albumina de soro bovino e timol	1 frasco 6mL	Pronto a usar
CAL N	Calibrador N = 0 a 5 (ver valores exatos nos rótulos dos frascos) em soro humano, benzamidina e timol	6 frascos ioflizados	Adicionar 2mL de água destilada
DIL SPE	Diluente de amostra: soro humano, benzamidina e timol	3 frascos ioflizados	Adicionar água destilada (veja no rótulo o volume exato)
WASH SOLN CONC	Solução de Lavagem (Tris-HCl)	1 frasco 10 mL	Diluir 200 x com água destilada (use um agitador magnético).
CONTROLO N	Controlos - N = 1 ou 2 em soro humano, benzamidina e timol	2 frascos ioflizados	Adicionar 2mL de água destilada
CHROM TMB	Cromogénio TMB (Tetrametilbenzidina)	1 frasco 25 mL	Pronto a usar
STOP SOLN	Solução de stop: HCl 1,0 N	1 frasco 12 mL	Pronto a usar

Observação: 1 Use o diluente de amostra para diluições de amostra.

2. 1 pg da preparação do calibrador é equivalente a 100 mIU do NIBSC 1sttS 86/680.

Para evitar desvios nos resultados, o tempo entre a pipetagem do primeiro calibrador e a última amostra deve ser limitado ao tempo mencionado na seção XIII parágrafo E (tempo de pipetagem).

Prepare uma curva de calibração para cada doseamento, não use dados de doseamentos anteriores.

A solução cromogénica deve ser incolor. Se uma cor azul se desenvolver dentro de alguns minutos após a preparação, isso indica que o reagente não pode ser usado e deve ser eliminado.

Dispense a solução cromogénica antes de transcorridos 15 minutos após a lavagem da microplaca.

Durante a incubação com solução cromogénica, evite a luz solar direta na placa

B. Procedimento

1. Selecione o número necessário de tiras para o doseamento. As tiras não utilizadas devem ser seladas no saco com um dessecante e armazenadas entre 2-8°C.
2. Prenda as tiras na estrutura de suporte.
3. Pipete 200 µl de cada Calibrador, Controlo e Amostra nos poços apropriados.
4. Pipete 50 µl de conjugado anti-IL-1β-HRP em todos os poços. Incube durante 2 horas a 18-25°C num agitador horizontal regulado para 700 rpm ± 100 rpm
5. Aspire o líquido de cada poço.
6. Lave a placa 3 vezes:
 - Dispense 0,4 ml de Solução de Lavagem em cada poço
 - Aspire o conteúdo de cada poço
7. Pipete 200 µl da Solução Cromogénica em cada poço dentro de 15 minutos após a etapa de lavagem.
8. Incube a placa de microtitulação por 15 minutos a 18-25°C num agitador horizontal ajustado para 700 rpm ± 100 rpm, evite a luz solar direta.
9. Pipete 100 µl de solução de Stop em cada poço.
10. Leia as absorbências a 450 nm e 490 nm (filtro de referência 630 nm ou 650 nm) dentro de 3 horas e calcule os resultados conforme descrito na seção XI.

XI. CÁLCULO DE RESULTADOS

A. Leitura Policromática:

1. Neste caso, o software fará o processamento dos dados.
2. A placa é lida primeiro a 450 nm contra um filtro de referência definido para 650 nm (ou 630 nm).
3. Uma segunda leitura é realizada a 490 nm contra o mesmo filtro de referência.
4. O Software controlará o leitor automaticamente e integrará ambas as leituras num modelo policromático. Esta técnica pode gerar ODs de até 10.
5. O princípio do processamento de dados policromáticos é o seguinte:
 - $X_i = OD$ a 450 nm
 - $Y_i = OD$ a 490 nm
 - Usando uma regressão linear não ponderada standard, os parâmetros A e B são calculados $Y = A \cdot X + B$
 - Se $X_i < 3$ unidades OD, então X calculado = X_i
 - Se $X_i > 3$ unidades OD, então X calculado = $(Y_i - B)/A$
 - Para construir a curva de calibração utilize a função 4 parâmetros logística.
 - A concentração de IL-1β nas amostras é determinada por interpolação na curva de calibração.

XII. CURVA PADRÃO

Os dados a seguir são apenas para ilustração e nunca devem ser usados para substituir os dados da curva de calibração em tempo real.

IL-1β-ELISA		Unidades OD Policromáticas modelo
calibrador	0 pg/ml	0,013
	24 pg/ml	0,121
	89 pg/ml	0,336
	320 pg/ml	1,042
	574 pg/ml	1,693
	1166 pg/ml	2,704

XIII. DESEMPENHO E LIMITAÇÕES

A. Limite de deteção

Foram testados vinte calibradores zero juntamente com um conjunto de outros calibradores. O limite de deteção, definido como a concentração dois desvios padrão acima da DO média do standard zero, foi de 0,35 pg/ml.

B. Especificidade

Não foi observada nenhuma reação cruzada significativa na presença de 500 ng/ml de IL-1α, IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, TNF-β, IFN-β, IFN-γ, TGF-β, GM-CSF, OSM, MIP-1α, MIP-1β, LIF, MCP-1, G-CSF, RANTES. Este ensaio de IL-1β é específico para IL-1β humana natural e recombinante.

C. Precisão

INTRA ENSAIO				INTER ENSAIO			
Sérum	N	$\bar{X} \pm SD$ (pg/ml)	cv (%)	Sérum	N	$\bar{X} \pm SD$ (pg/ml)	cv (%)
A	10	127 ± 3	2.3	A	20	120 ± 6	4.9
B	10	733 ± 11	1.4	B	20	549 ± 14	2.5

SD: Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação

D. Precisão

TESTE DE RECUPERAÇÃO

Amostra	Adicionado IL-1β (pg/ml)	IL-1β recuperado (pg/ml)	Recuperação (%)
Sérum	1282	1196	93
	605	542	90
	329	314	95
	151	131	84
	72	64	89
	31	28	92
Plasma	1282	1208	94
	605	573	95
	329	321	97
	151	146	93
	72	67	92
	31	29	94

TESTE DE DILUIÇÃO

Amostra	Diluição	CONCENTRAÇÃO TEÓRICA. (pg/ml)	Concentração medida. (pg/ml)
Sérum	1/1	-	1197
	1/2	598	637
	1/4	299	320
	1/8	150	164
	1/16	75	86
	1/32	37	41
Plasma	1/1	-	688
	1/2	344	336
	1/4	172	172
	1/8	86	87
	1/16	43	51
	1/32	26	22
	1/64	13	9
	1/128	4	4

As amostras foram diluídas com diluente de amostra.

E. Tempo entre pipetagem do último calibrador e da amostra

Conforme indicado a seguir, os resultados do ensaio permanecem precisos mesmo quando uma amostra é dispensada 30 minutos após os calibradores terem sido adicionados aos poços revestidos

TEMPO DE DEMORA				
	T0	10 minutos	20 minutos	30 minutos
1	1485	1575	1553	1647
2	1123	1129	1150	1228
4	592	572	595	606
5	375	391	375	375
6	1454	1429	1438	1605
500	641	583	645	658
1000	1107	1087	1158	1158
1500	1440	1261	1399	1425

F. Efeito Hook

Uma amostra enriquecida com IL-1 β até 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ origina DOs mais altos do que o último ponto do calibrador.

XIV. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

- Se os resultados obtidos para o Controle 1 e/ou Controle 2 não estiverem dentro do intervalo especificado no rótulo do frasco, os resultados não podem ser usados a menos que tenha sido fornecida uma explicação satisfatória para a discrepância.
- Se desejar, cada laboratório pode fazer seus próprios pools de amostras de controlo, que devem ser mantidas congeladas em alíquotas. Os controlos que contêm azida interferem na reação enzimática e não podem ser usados.
- Os critérios de aceitação para a diferença entre os resultados duplicados das amostras devem basear-se nas Boas Práticas de Laboratório
- Recomenda -se que os controlos sejam analisados rotineiramente como amostras desconhecidas para medir a variabilidade do ensaio. O desempenho do ensaio deve ser monitorizado com gráficos de controlo de qualidade.
- É uma boa prática verificar visualmente o ajuste da curva selecionado pelo computador.

XV. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Estes valores são fornecidos apenas para orientação; cada laboratório deve estabelecer sua própria faixa de valores normais.

Para orientação, a média de 22 amostras de soro normal foi de 5,4 pg/ml ($DP = 3,9$), variando entre 0 pg/ml e 13,6 pg/ml . Este estudo foi realizado em amostras de indivíduo aparentemente saudáveis com baixos níveis de PCR.

Para orientação, a média de 103 plasma normal foi de 2,6 pg/ml ($DP = 5,3$), variando entre 0 pg/ml e 17 pg/ml (baseado no percentil 2,5% a 97,5%). Este estudo foi realizado com amostras colhidas em condições de amostragem rigorosas.

XVI. PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

Segurança

Apenas para uso em diagnóstico *in vitro*.

Os componentes do sangue humano incluídos neste kit foram testados por métodos europeus aprovados e/ou aprovados pela FDA e deram resultados negativos para HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 e 2. Nenhum método conhecido pode oferecer garantia total de que os derivados do sangue humano não transmitem hepatite, HIV ou outras infecções. Portanto, o manuseamento de reagentes, amostras de soro ou plasma deve estar de acordo com os procedimentos de segurança locais. Todos os produtos e derivados de origem animal foram colhidos de animais saudáveis. Os componentes bovinos são originários de países onde a BSE não foi notificada. No entanto, os componentes que contêm substâncias de origem animal devem ser tratados como potencialmente infeciosos.

Evite qualquer contato da pele com todos os reagentes, a solução de Stop contém HCl. Em caso de contacto, lave abundantemente com água.

Não fume, beba, coma ou aplique cosméticos na área de trabalho. Não pipetar com a boca. Use roupas de proteção e luvas descartáveis.

XVII. BIBLIOGRAFIA

- OPPENHEIM JJ e GERY I., (1982). **A interleucina-1 é mais do que uma interleucina.** Immunology Today, 3:113-119.
- MIZEL SB, (1982). **Interleucina-1 e ativação de células** T. imunol. Rev., 63:51-71.
- DINARELLO CA, (1984). **Interleucina-1 e a patogênese da resposta de fase aguda.** N. Eng. J. Med., 311:1413-1418.
- DINARELLO CA, (1985). **Uma atualização sobre a interleucina-1 humana: da biologia molecular à relevância clínica.** J. Clin. Immunol., 5:287-297.
- BAILLY, S. et al., (1994) **Produção comparativa de IL-1 β e IL-1 α por monócitos humanos estimulados por LPS: medição de ELISAs revisitada.** Cytokine, 6:111-115.
- DINARELLO CA, (1988) **Biologia da interleucina-1.** FASEB J., 2:108-115.

XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

CALIBRADORES (μl)	AMOSTRA(S) CONTROLOS (μl)
Calibradores (0-5)	200
Amostras, Controlos	-
Conjugado anti-IL-1 β -HRP	50
	200
	50
Incubar durante 2 horas a 18-25°C com agitação contínua a 700 rpm. Aspirar o conteúdo de cada poço. Lavar 3 vezes com 400 μl de Solução de Lavagem e aspirar.	
Solução cromogénica	200
Incubar por 15 min a 18-25°C com agitação contínua a 700 rpm.	
Solução de Stop	100
Leia num leitor de placas e registe a absorbância de cada poço a 450 nm (ou 490 nm) versus 630 (ou 650 nm)	

Outras traduções desta Instrução de Uso podem ser baixadas em nosso site : <https://www.diasource-diagnostics.com/>