



IVD

CE

IL-8-ELISA

KAP1301

Version : 231023

Date of issue : 23/10/2023

Revision date: 23/10/2023

History

Summary of change:

| Current Version: 230123 | Current Version: 231023 |
|-----------------------------------|---|
| | <p><i>V. REAGENTS PROVIDED</i></p> <p>-Removal of the column relative to the color code of the reagents</p> <p><u>-Spanish version only:</u> Correction of a TYPO in the matrix of the Calibrators (correction from serum into plasma)</p> |

Read entire protocol before use.

IL-8-ELISA

I. INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the in vitro quantitative measurement of human interleukin-8 (IL-8) in plasma.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource IL-8-ELISA Kit
- B. **Catalogue number :** KAP1301 : 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

IL-8 (also known as NAP-1 for Neutrophil-activating peptide) is a chemoattractant protein for neutrophils. This cytokine belongs to a new family of chemotactic peptides called "chemokines". This proinflammatory mediator is secreted by different cells such as monocytes, neutrophils, endothelial cells, fibroblast after activation, and by mitogen-stimulated T lymphocytes. IL-8 is a key cytokine that has been found in scales of psoriasis patients, in synovial fluid of patients suffering from rheumatoid arthritis and gout. The role of IL-8 in the recruitment of neutrophils in the lung during ARDS has also been suggested.


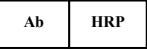
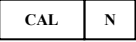
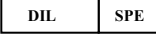
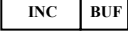

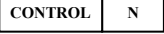

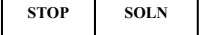
B. Clinical application

The IL-8 level in the septic shock patients was found to correlate with mortality and in acute graft liver rejection the IL-8 serum levels were reported to have markedly increased. The level of IL-8 in these or other conditions may prove to be important in characterizing the progress of these disease conditions.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIIAsource IL-8-ELISA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on microtiterplate. The assay uses monoclonal antibodies (MAbs) directed against distinct epitopes of IL-8. 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-8 – 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-8 concentration. A calibration curve is plotted and IL-8 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 | Reconstitution |
|--|---------------------|---|
|  Microtiterplate (96 breakable wells) anti IL-8 (monoclonal antibodies) coated wells | 96 wells | Ready for use |
|  Conjugate: HRP labelled anti-IL-8 (monoclonal antibodies) in TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin and thymol | 1 vial 6 ml | Ready for use |
|  Calibrator N = 0 to 5 (see exact values on vial labels) in human plasma with benzamidine and thymol | 6 vials lyophil. | Add 1 ml distilled water |
|  Specimen Diluent: human plasma with benzamidine and thymol | 2 vials lyophil. | Add distilled water (see on the label for the exact volume) |
|  Incubation Buffer: Phosphate buffer with bovine serum albumin and thymol | 1 vial 11 ml | Ready for use |
|  Wash Solution (Tris-HCl) | 1 vial 10 ml | Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer). |
|  Controls - N = 1 or 2 in human plasma with thymol | 2 vials lyophil. | Add 1 ml distilled water |
|  Chromogen TMB (Tetramethylbenzidine) | 1 vial 12 ml | Ready for use |
|  Stop Solution: HCl 1.0N | 1 vial 12 ml | Ready for use |

Note: 1. Use Specimen Diluent for sample dilutions.

2. 1 pg of the calibrator preparation is equivalent to 1 mU of the NIBSC 1st IS 89/520.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

- High quality distilled water
- Pipettes for delivery of: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml and 10 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Horizontal microtiterplate shaker capable of 700 rpm ± 100 rpm
- Washer for Microtiterplates
- 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

- Calibrators:** Reconstitute calibrators with 1 ml distilled water.
- Controls:** Reconstitute the controls with 1 ml distilled water.
- Specimen Diluent:** Reconstitute specimen diluent to the volume specified on the vial label with distilled water
- 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

- 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-8 production by blood cells and thus falsely increase plasma IL-8 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

- 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.
- Secure the strips into the holding frame.
- Pipette 100 µl of Incubation Buffer into all the wells
- Pipette 100 µl of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
- Pipette 50 µl of anti-IL-8-HRP conjugate into all the wells.
- Incubate for 2 hours at 18-25°C on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm.
- Aspirate the liquid from each well.
- Wash the plate 3 times by:
 - Dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well
 - Aspirating the content of each well
- Pipette 100 µl of the Chromogenic Solution into each well within 15 minutes following the washing step.
- Incubate the microtiterplate for 15 minutes at 18-25°C on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm, avoid direct sunlight.
- Pipette 100 µl of Stop solution into each well.
- Read the absorbencies at 450 nm and 490 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 30 minutes and calculate the results as described in section XI.

XI. CALCULATION OF RESULTS

A. Polychromatic Reading:

- In this case, the software will do the data processing.
- The plate is first read at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
- A second reading is performed at 490 nm against the same reference filter.
- 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.
- 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: $Y = A \cdot X + B$
 - 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-8 concentration in samples is determined by interpolation on the calibration curve.

B. Bichromatic Reading

- Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
- Calculate the mean of duplicate determinations.
- On semi-logarithmic or linear graph paper plot the OD values (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of IL-8 (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points by connecting the plotted points with straight lines.
- Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
- 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-8-ELISA | | OD units |
|------------|------------|---------------------|
| | | Polychromatic model |
| Calibrator | 0 pg/ml | 0.029 |
| | 40.4 pg/ml | 0.120 |
| | 58 pg/ml | 0.164 |
| | 156 pg/ml | 0.423 |
| | 551 pg/ml | 1.350 |
| | 1845 pg/ml | 2.973 |

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 1,1 pg/ml.

B. Specificity

No significant cross-reaction was observed in presence of 50 ng of IL-1α, IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, TNF-α, TNF-β, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, TGF-β, GM-CSF, OSM, MIP-1α, MIP-1β, LIF, MCP-1, G-CSF, RANTES, PF-4, βTG, GRO, IP-10 and SCF. This IL-8 assay is specific for human natural and recombinant IL-8 and is able to recognize the 72 a.a. form of IL-8.

C. Precision

| INTRA ASSAY | | | | INTER ASSAY | | | |
|-------------|----|------------------|--------|-------------|----|------------------|--------|
| Serum | N | <X> ± SD (pg/ml) | CV (%) | Serum | N | <X> ± SD (pg/ml) | CV (%) |
| A | 12 | 102 ± 3 | 3.2 | A | 20 | 150 ± 13 | 8.6 |
| B | 12 | 227 ± 8 | 3.6 | B | 20 | 442 ± 58 | 13.1 |

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST

| Sample | Added IL-8 (pg/ml) | Recovered IL-8 (pg/ml) | Recovery (%) |
|--------|--------------------|------------------------|--------------|
| Plasma | 0 | 0 | - |
| | 61 | 65 | 105 |
| | 108 | 127 | 118 |
| | 292 | 349 | 119 |

DILUTION TEST

| Sample | Dilution | Theoretical Concent. (pg/ml) | Measured Concent. (pg/ml) |
|--------|----------|------------------------------|---------------------------|
| Plasma | 1/1 | - | 678 |
| | 1/2 | 339 | 272 |
| | 1/4 | 169 | 148 |
| | 1/8 | 85 | 82 |
| | 1/16 | 42 | 40 |

Samples were diluted with Specimen Diluent.

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

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

TIME DELAY

| sample | 0 min | 10 min | 20 min | 30 min | 40 min |
|--------|-------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | 66 | 53 | 59 | 55 | 62 |
| 2 | 118 | 114 | 111 | 108 | 113 |
| 3 | 246 | 224 | 221 | 213 | 221 |
| 4 | 914 | 906 | 905 | 882 | 855 |

F. Hook effect

A sample spiked with IL-8 up to 0.5 µg/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 duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises
- It is recommended that controls be routinely assayed as unknown samples to measure assay variability. The performance of the assay should be monitored with quality control charts of the controls.
- It is good practise to check visually the curve fit selected by the computer.

XV. REFERENCE INTERVALS

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

For guidance, the results of 36 EDTA plasma samples from apparently healthy persons with low CRP levels, ranged between 0 and 132 pg/ml. Among them, 34 samples obtained values below 50 pg/ml.

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

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

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

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

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

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. MATSUHUMA K., et al. (1989). **Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line.** J. Exp. Med., 169 : 1485-1490.
2. BAGGIOLINI M., et al. (1989). **Neutrophil-activating peptide-1/Interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils.** J. Clin. Invest., 84 : 1045-1049.
3. HACK C., et al. (1992). **Interleukin-8 in sepsis : relation to shock and inflammatory mediators.** Infect. Immun., 60 : 2835-2842.
4. TILG H., et al. (1992). **Interleukin-8 serum concentrations after liver transplantation.** Transplant, 53 : 800-803.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

| | CALIBRATORS (µl) | SAMPLE(S) CONTROLS (µl) |
|---|---------------------|-------------------------------|
| Incubation Buffer | 100 | 100 |
| Calibrators (0-5) | 100 | - |
| Samples, Controls | - | 100 |
| Anti-IL-8 -HRP conjugate | 50 | 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 µl of Wash Solution and aspirate. | | |
| Chromogenic Solution | 100 | 100 |
| 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/>

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

IL-8-ELISA

I. VERWENDUNGSZWECK

Enzymimmunoassay zur quantitativen In-vitro-Bestimmung von humanem Interleukin-8 (IL-8) in Plasma.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. Handelsbezeichnung:** DIAsource IL-8-ELISA Kit
- B. Katalognummer:** KAP1301: 96 Tests
- C. Hersteller:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

**Für technische Unterstützung oder Bestellinformationen wenden Sie sich bitte an:
Tel.: +32 (0)10 84 99 11 Fax: +32 (0)10 84 99 91**

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Biologische Aktivität

IL-8 (auch als NAP-1 für ‚Neutrophile aktivierendes Peptid‘ bekannt) ist ein chemoattraktives Protein für Neutrophile. Dieses Zytokin gehört zu einer neuen Familie von chemoattraktiven Peptiden namens „Chemokine“. Dieser Entzündungsmediator wird von verschiedenen Zellen wie Monozyten, Neutrophilen, Endothelzellen, Fibroblasten nach Aktivierung und von mitogenstimulierten T-Lymphozyten abgesondert. IL-8 ist ein Schlüssezytokin, das in großem Umfang bei Psoriasis-Patienten, in der Gelenkflüssigkeit von Patienten, die an rheumatischer Arthritis und Gicht leiden, gefunden wurde. Ebenfalls wird vermutet, dass IL-8 bei der Rekrutierung von Neutrophilen in der Lunge bei akuter respiratorischer Insuffizienz eine Rolle spielt.

B. Klinische Anwendung


Der IL-8-Spiegel bei Patienten mit septischem Schock korreliert offenbar mit der Sterblichkeit, und bei akuter Abstoßung von Lebertransplantaten wurde eine deutliche Erhöhung der IL-8-Serum-Spiegel berichtet. Der IL-8-Spiegel bei diesen und anderen Erkrankungen könnte sich als wichtig bei der Beschreibung des Fortschreitens dieser Krankheitssymptome herausstellen.

IV. GRUNDSÄTZE DER METHODE

Der DIASource IL-8-ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf Mikrotiterplatten durchgeführt wird. Der Assay nutzt monoklonale Antikörper (MAKs), die gegen verschiedene Epitope von IL-8 gerichtet sind. Kalibratoren und Proben reagieren mit dem monoklonalen Fängerantikörper (MAK 1), mit dem die Kavitäten 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: MAK-1-Beschichtung – humanes IL-8 – MAK 2 – MRP. Nicht gebundene enzymmarkierte Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Gebundene enzymmarkierte Antikörper werden durch eine Farbreaktion bestimmt. Chromogene Lösung (TMB) wird hinzugefügt und inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe einer Stopplösung angehalten, und die Mikrotiterplatte wird bei der geeigneten Wellenlänge gelesen. Die Menge an Substratumsatz wird kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die proportional zur IL-8-Konzentration ist.

Es wird eine Kalibrationskurve erstellt, und die IL-8-Konzentration der Proben wird durch Interpolation von der Kalibrationskurve bestimmt. Der Einsatz des ELISA-Lesegeräts (Linearität bis zu 3 OD-Einheiten) und einer durchdachten Datenreduktionsmethode (polychromatische Datenreduktion) ergibt eine hohe Sensibilität im unteren Bereich und in einem erweiterten Kalibrierbereich.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

| Reagenzien | 96 Tests Kit | Rekonstitution | | | |
|---|--------------|------------------------|-------------------------------|---|---|
|  Mikrotiterplatte (96 abbrechbare Kavitäten) mit anti-IL-8-beschichteten Kavitäten (monoklonale Antikörper) | 96 Kavitäten | Gebrauchsfertig | | | |
| <table border="1" data-bbox="130 981 280 1025"><tr><td>Ab</td><td>HRP</td></tr></table> Konjugat: MRP-markierte Anti-IL-8 (monoklonale Antikörper) in TRIS-Maleat-Puffer mit Rinderserumalbumin und Thymol | Ab | HRP | 1 Fläschchen 6 ml | Gebrauchsfertig | |
| Ab | HRP | | | | |
| <table border="1" data-bbox="130 1153 264 1198"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibrator N = 0 bis 5 (für genaue Werte siehe Fläschchenetiketten) in humanem Plasma mit Benzamidin und Thymol | CAL | N | 6 Fläschchen lyophilisiert | 1 ml destilliertes Wasser hinzufügen | |
| CAL | N | | | | |
| <table border="1" data-bbox="130 1326 293 1370"><tr><td>DIL</td><td>SPE</td></tr></table> Probenverdünnungsmittel: humanes Plasma mit Benzamidin und Thymol | DIL | SPE | 2 Fläschchen lyophilisiert | Destilliertes Wasser hinzufügen (für das genaue Volumen siehe das Etikett) | |
| DIL | SPE | | | | |
| <table border="1" data-bbox="130 1453 264 1498"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Inkubationspuffer: Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin und Thymol | INC | BUF | 1 Fläschchen 11 ml | Gebrauchsfertig | |
| INC | BUF | | | | |
| <table border="1" data-bbox="130 1581 319 1626"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Waschlösung (Tris-HCl) | WASH | SOLN | CONC | 1 Fläschchen 10 ml | 200 x mit destilliertem Wasser verdünnen (Magnetrührer verwenden). |
| WASH | SOLN | CONC | | | |
| <table border="1" data-bbox="130 1686 293 1731"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontrollen - N = 1 oder 2 in humanem Plasma mit Thymol | CONTROL | N | 2 Fläschchen lyophilisiert | 1 ml destilliertes Wasser hinzufügen | |
| CONTROL | N | | | | |
| <table border="1" data-bbox="130 1814 341 1859"><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table> Chromogenes TMB (Tetramethylbenzidin) | CHROM | TMB | 1 Fläschchen 12 ml | Gebrauchsfertig | |
| CHROM | TMB | | | | |
| <table border="1" data-bbox="130 1942 303 1986"><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> Stopplösung: HCl 1.0 N | STOP | SOLN | 1 Fläschchen 12 ml | Gebrauchsfertig | |
| STOP | SOLN | | | | |

Anmerkung:

- Benutzen Sie das Probenverdünnungsmittel zur Probenverdünnung.
- 1 pg der Kalibratorzubereitung entspricht 1 mU des NIBSC 1. IS 89/520.

VI. NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL

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

- Hochwertiges destilliertes Wasser
- Pipetten für: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml und 10 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen aus Kunststoff wird empfohlen)
- Vortexmixer
- Magnetrührer
- Horizontaler Mikrotiterplatten-Schüttler, Leistung 700 U/min ± 100 U/min
- Waschgerät für Mikrotiterplatten
- Mikrotiterplatten-Lesegerät zur Auswertung bei 450 nm, 490 nm und 650 nm (bei polychromatischer Auswertung) oder Auswertungsmöglichkeit bei 450 nm und 650 nm (bei bichromatischer Auswertung)

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Kalibratoren:** Die Kalibratoren mit 1 ml destilliertem Wasser rekonstituieren.
- Kontrollen:** Die Kontrollen mit 1 ml destilliertem Wasser rekonstituieren.
- Probenverdünnungsmittel:** Das Probenverdünnungsmittel bis auf das auf dem Fläschchenetikett angegebene Volumen mit destilliertem Wasser rekonstituieren.
- Arbeitswaschlösung:** Ein angemessenes Volumen an Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (200 x) mit 199 Anteilen destilliertem Wasser herstellen. Mit einem Magnetrührer homogenisieren. Nicht verwendete Arbeitswaschlösung nach jedem Arbeitstag entsorgen.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND VERFALLSDATUM DER HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder Rekonstituieren sind alle Kitkomponenten bei 2 bis 8 °C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Nicht verwendete Streifen müssen bis zum Verfallsdatum in einem Folienbeutel dicht verschlossen mit Trocknungsmittel bei 2° bis 8 °C gelagert werden.
- Nach ihrer Rekonstitution sind Kalibratoren, Kontrollen und Probenverdünnungsmittel vier Tage bei 2 bis 8 °C haltbar. Für längere Lagerungszeiten sind sie zu aliquotieren und bei -20 °C maximal zwei Monat aufzubewahren. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.
- Die konzentrierte Waschlösung ist bei 18 bis 25 °C bis zum Verfallsdatum haltbar.
- Die frisch hergestellte Arbeitswaschlösung sollte am selben Tag aufgebraucht werden.
- Nach der ersten Benutzung ist das Konjugat bei Lagerung im dicht verschlossenen Original-Fläschchen und bei 2 bis 8 °C bis zum Verfallsdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können auf Instabilität bzw. Zerfall hindeuten.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.
- Vor Gebrauch sollten alle Proben 18 bis 25 °C erreichen. Vortexmischen der Proben wird vor Gebrauch empfohlen.
- Die Bedingungen der Probenahme können die Werte beeinflussen. Daher müssen strikte Vorsichtsmaßnahmen während der Probenahme getroffen werden, um Unreinheiten im Probenmaterial zu vermeiden, die die Produktion von IL-8 durch Blutzellen stimulieren und so fälschlicherweise die IL-8-Werte im Plasma erhöhen würden.
- Probenröhrchen müssen pyrogenfrei sein. Plasma kann auf steriler EDTA gesammelt und nach der Zentrifugierung rasch getrennt werden. Vom Gebrauch von Heparinröhrchen wird abgeraten, da Heparin-Batches oft mit Pyrogen kontaminiert sind.

X. DURCHFÜHRUNG

A. Hinweise zur Handhabung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Verfallsdatum.

Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht.

Bringen Sie alle Reagenzien vor Gebrauch auf 18 bis 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 Herstellung der Waschlösung einen sauberen Kunststoffbehälter.

Verwenden Sie zur Zugabe jedes Reagenzes und jeder Probe saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.

Verwenden Sie zur Pipettierung der chromogenen Lösung und der Stopplösung keine Pipetten mit Metallteilen.

Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.

Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.

Zur Vermeidung von Drift muss die Zeit zwischen dem Pipettieren des ersten Kalibrators und der letzten Probe auf die Zeit beschränkt werden, die in Abschnitt XIII Absatz E (Zeitverzögerung) erwähnt wird.

Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve. Verwenden Sie keine Daten von früheren Durchläufen.

Die chromogene Lösung sollte farblos sein. Verfärbt sie sich innerhalb weniger Minuten nach der Herstellung blau, bedeutet dies, dass das Reagenz unbrauchbar ist und entsorgt werden muss.

Pipettieren Sie die chromogene Lösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte.

Während der Inkubation mit der chromogenen Lösung ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

B. Verfahren

- Wählen Sie die erforderliche Anzahl von Streifen für den Durchgang. Die nicht verwendeten Streifen sollten wieder fest im Beutel verschlossen mit einem Trocknungsmittel und bei 2 bis 8 °C gelagert werden.
- Die Streifen im Halterahmen befestigen.
- 100 µl Inkubationspuffer in alle Kavitäten pipettieren.
- Jeweils 100 µl Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
- 50 µl Anti-IL-8-MRP Konjugat in alle Kavitäten pipettieren.
- Zwei Stunden bei 18 bis 25 °C auf einem horizontalen Schüttler bei 700 U/min ± 100 U/min inkubieren.
- Flüssigkeit aus jeder Kavität absaugen.
- Platte drei Mal wie folgt waschen:
 - 0,4 ml Waschlösung in jede Kavität geben
 - Inhalt aus jeder Kavität absaugen
- Binnen 15 Minuten nach dem Waschschrift 100 µl der chromogenen Lösung in jede Kavität pipettieren.
- Die Mikrotiterplatte 15 Minuten bei 18 bis 25 °C auf einem Schüttler mit 700 U/min ± 100 U/min inkubieren. Direktes Sonnenlicht vermeiden.
- 100 µl Stopplösung in jede Kavität pipettieren.
- Absorptionen bei 450 nm und 490 nm (Referenzfilter 630 nm oder 650 nm) binnen 30 Minuten ablesen und Ergebnisse wie in Abschnitt XI beschrieben berechnen.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

A. Polychromatische Auswertung:

- In diesem Fall übernimmt die Software die Datenverarbeitung.
- Platte zuerst bei 450 nm unter Vergleich mit einem Referenzfilter von 650 nm (oder 630 nm) ablesen.
- Bei 490 nm wird zweite Ablesung unter Vergleich mit demselben Referenzfilter durchführen.
- Die Software steuert das Lesegerät automatisch und integriert beide Ablesungen in ein polychromatisches Modell. Mit dieser Technik können ODs bis 10 generiert werden.
- Das Prinzip der polychromatischen Datenverarbeitung sieht folgendermaßen aus:
 - $X_i = OD$ bei 450 nm
 - $X_i = OD$ bei 490 nm
 - Mithilfe einer standardisierten, ungewichteten linearen Regression werden die Parameter A und B berechnet: $Y = A * X + B$
 - Wenn $X_i < 3$ OD-Einheiten, dann X berechnet = X_i
 - Wenn $X_i > 3$ OD-Einheiten, dann X berechnet = $(Y_i - B) / A$
 - Eine Vier-Parameter-Logistikkurven-Angleichung wird verwendet, um die Kalibrationskurve zu erstellen.

- Die IL-8-Konzentration der Proben wird durch Interpolation von der Kalibrationskurve bestimmt.

B. Bichromatische Auswertung

- Platte bei 450 nm unter Vergleich mit einem Referenzfilter von 650 nm (oder 630 nm) ablesen.
- Den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen berechnen.
- Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier die OD-Werte (Ordinate) für jeden Kalibrator gegen die entsprechende Konzentration von IL-8 (Abszisse) ein und zeichnen Sie eine Kalibrationskurve durch die Kalibrationspunkte, indem Sie die eingetragenen Punkte durch gerade Linien verbinden.
- Lesen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation auf der Kalibrationskurve ab.
- Computergestützte Datenreduktion kann diese Berechnungen vereinfachen. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer Vier-Parameter-Kurvenfunktion.

XII. TYPISCHE WERTE

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

| IL-8-ELISA | | OD-Einheiten |
|------------|------------|--------------------------|
| | | Polychromatisches Modell |
| Kalibrator | 0 pg/ml | 0,029 |
| | 40,4 pg/ml | 0,120 |
| | 58 pg/ml | 0,164 |
| | 156 pg/ml | 0,423 |
| | 551 pg/ml | 1,350 |
| | 1845 pg/ml | 2,973 |

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN

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 OD-Durchschnitt bei Nullbindung, entsprach 1,1 pg/ml.

B. Spezifität

Es wurde keine signifikante Kreuzreaktion bei Vorhandensein von 50 ng IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, TNF- α , TNF- β , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TGF- β , GM-CSF, OSM, MIP-1 α , MIP-1 β , LIF, MCP-1, G-CSF, RANTES, PF-4, β TG, GRO, IP-10 und SCF beobachtet. Dieser IL-8-Assay ist spezifisch für humanes natürliches und rekombinantes IL-8 und kann die 72 Antikörper-Form von IL-8 erkennen.

C. Präzision

| INTRA-ASSAY | | | | INTER-ASSAY | | | |
|-------------|----|------------------|--------|-------------|----|------------------|--------|
| Serum | N | <X> ± SD (pg/ml) | CV (%) | Serum | N | <X> ± SD (pg/ml) | CV (%) |
| A | 12 | 102 ± 3 | 3,2 | A | 20 | 150 ± 13 | 8,6 |
| B | 12 | 227 ± 8 | 3,6 | B | 20 | 442 ± 58 | 13,1 |

SD: Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST

| Probe | Zugegebenes IL-8 (pg/ml) | Zurückgewonnenes IL-8 (pg/ml) | Rückgewinnung (%) |
|--------|--------------------------|-------------------------------|-------------------|
| Plasma | 0 | 0 | - |
| | 61 | 65 | 105 |
| | 108 | 127 | 118 |
| | 292 | 349 | 119 |

VERDÜNNUNGSTEST

| Probe | Verdünnung | Theoretische Konzentration (pg/ml) | Gemessene Konzentration (pg/ml) |
|--------|------------|------------------------------------|---------------------------------|
| Plasma | 1/1 | - | 678 |
| | 1/2 | 339 | 272 |
| | 1/4 | 169 | 148 |
| | 1/8 | 85 | 82 |
| | 1/16 | 42 | 40 |

Die Proben wurden mit Probenverdünnungsmittel verdünnt.

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Wie im Folgenden gezeigt, bleibt die Genauigkeit der Assays selbst dann gewährleistet, wenn die Probe 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Kavitäten zugegeben wird.

ZEITVERZÖGERUNG

| Probe | 0 min | 10 min | 20 min | 30 min | 40 min |
|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | 66 | 53 | 59 | 55 | 62 |
| 2 | 118 | 114 | 111 | 108 | 113 |
| 3 | 246 | 224 | 221 | 213 | 221 |
| 4 | 914 | 906 | 905 | 882 | 855 |

F. Hook-Effekt

Eine Probe mit IL-8 bis zu 0,5 µg/ml liefert höhere OD-Werte als der letzte Kalibratorwert.

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Werte bei Kontrolle 1 und/oder Kontrolle 2 nicht dem auf dem Fläschchenetikett angegebenen Bereich, können die Ergebnisse ohne hinreichende Erklärung der Abweichungen nicht verwendet werden.
- Falls gewünscht, kann jedes Labor seine eigenen Pools mit Kontrollproben herstellen, die aliquotiert eingefroren werden sollten. Azid enthaltende Kontrollen 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 sollte mit den Qualitätskontrollkarten der Kontrollen überprüft werden.
- Es gilt als gute Praxis, visuell die vom Computer gewählte Kurvenanpassung zu prüfen.

XV. ZU ERWARTENDE BEREICHE

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

Als Anhaltspunkt: Die Ergebnisse von 36 ETDA-Plasmaproben von augenscheinlich gesunden Personen mit niedrigen CRP-Spiegeln lagen zwischen 0 und 132 pg/ml. Die Werte von 34 dieser Proben lagen unter 50 pg/ml.

XVI. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur zur *In-vitro*-Diagnostik.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und/oder in 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 liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den lokalen Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern, in denen BSE nicht nachgewiesen wurde. Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potentiell ansteckend behandelt werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien, die Stopplösung enthält HCl. Bei Kontakt gründlich mit Wasser waschen.

Bitte im Arbeitsbereich nicht rauchen, trinken, essen oder Kosmetika anwenden. Nicht mit dem Mund pipettieren. Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe tragen.

XVII. LITERATUR

- MATSUHUMA, K. et al. (1989). **Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line.** J. Exp. Med., 169: 1485–1490.
- BAGGIOLINI, M. et al. (1989). **Neutrophil-activating peptide-1/Interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils.** J. Clin. Invest., 84: 1045–1049.
- HACK, C. et al. (1992). **Interleukin-8 in sepsis: relation to shock and inflammatory mediators.** Infect. Immun., 60: 2835–2842.
- TILG, H. et al. (1992). **Interleukin-8 serum concentrations after liver transplantation.** Transplant, 53: 800–803.

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

| | KALIBRATOREN (µl) | PROBE(N) KONTROLLEN (µl) |
|---|-------------------|--------------------------|
| Inkubationspuffer | 100 | 100 |
| Kalibratoren (0–5) | 100 | - |
| Proben, Kontrollen | - | 100 |
| Anti-IL-8-MRP Konjugat | 50 | 50 |
| Zwei Stunden bei 18 bis 25 °C unter ständigem Schütteln bei 700 U/min inkubieren. Inhalt aus jeder Kavität absaugen. 3 Mal mit 400 µl Waschlösung waschen und absaugen. | | |
| Chromogene Lösung | 100 | 100 |
| 15 Minuten bei 18 bis 25 °C unter ständigem Schütteln bei 700 U/min inkubieren. | | |
| Stopplösung | 100 | 100 |
| Auf einem Mikrotiterplatten-Lesegerät auswerten und die Absorption jeder Kavität bei 450 nm (und 490 nm) gegenüber 630 nm (oder 650 nm) verzeichnen. | | |

Andere Übersetzungen dieser Gebrauchsanweisung können von unserer Website heruntergeladen werden: <https://www.diasource-diagnostics.com/>



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

IL-8-ELISA

I. USO DEL KIT

Kit immunoenzimetrico per la determinazione quantitativa in vitro dell'interleuchina-8 umana (IL-8) in plasma.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIAsource IL-8-ELISA Kit
- B. Numero di catalogo:** KAP1301 : 96 tests
- C. Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche

La IL-8, nota anche come NAP-1 (Peptide Attivante i Neutrofili), è una proteina chemioattraente per i neutrofili. Tale citochina appartiene ad una nuova famiglia di peptidi chemiotattici chiamati "chemochine". È un mediatore proinfiammatorio che viene secreto da differenti tipi di cellule quali monociti, neutrofili, cellule endoteliali, fibroblasti attivati e linfociti T fitogeno-stimolati. La IL-8 è una citochina chiave la cui presenza è stata rilevata nelle scaglie di pazienti affetti da psoriasi e nel fluido sinoviale di soggetti affetti da artrite reumatoide e gotta. È stato altresì suggerito un ruolo attivo della IL-8 nel reclutamento di neutrofili nel polmone di soggetti con ARDS.

B. Applicazione clinica


In pazienti con shock settico, i livelli di IL-8 sono risultati correlati alla mortalità, e in caso di rigetto acuto dopo trapianto di fegato sono stati evidenziati livelli di IL-8 marcatamente aumentati. La misurazione dei livelli di IL-8 nei casi succitati e in altre condizioni potrebbe dimostrare una sua validità nella valutazione della progressione della malattia.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

DIASource IL-8-ELISA è un immunosaggio a sensibilità amplificata a fase solida eseguito su piastre di microtitolazione. Il dosaggio utilizza anticorpi monoclonali (Mabs) diretti contro epitopi distinti dell'IL-8. I calibratori e i campioni reagiscono con la cattura dell'anticorpo monoclonale (Mab 1) che riveste il pozzetto di microtitolazione e con un anticorpo monoclonale (Mab 2) marcato con horseradish perossidasi (HRP). Dopo un periodo di incubazione che consenta la formazione di un sandwich: Mab 1 di rivestimento – IL-8 umana – Mab 2 – HRP, la piastra di microtitolazione viene lavata per rimuovere l'anticorpo marcato con enzima non legato. L'anticorpo marcato con enzima non legato viene misurato attraverso una reazione cromogena. Si procede quindi con l'aggiunta della soluzione cromogena (TMB) e successiva incubazione. La reazione viene interrotta con l'aggiunta di Soluzione di arresto; quindi la piastra di microtitolazione viene letta alla lunghezza d'onda adeguata. La quantità di turnover del substrato viene determinata colorimetricamente misurando l'assorbanza che è proporzionale alla concentrazione di IL-8.

Viene tracciata una curva di calibrazione e la concentrazione IL-8 nei campioni viene determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione. L'utilizzo del lettore ELISA (linearità fino a 3 unità OD) associato all'impiego di un sofisticato metodo di riduzione dati (riduzione dati policromatica) garantisce un'elevata sensibilità nel range basso dei valori e un esteso range di calibrazione.

V. REATTIVI FORNITI

| Reattivi | Kit da 96 test | Volume di ricostituzione | | | |
|---|----------------|--------------------------|------------------------|--|--|
|  Micropiastra (96 pozzetti divisibili) pozzetti rivestiti anti IL-8 (anticorpi monoclonali) | 96 pozzetti | Pronte per l'uso | | | |
| <table border="1" data-bbox="140 947 300 992"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> </tr> </table> Coniugato: anti-IL-8 (anticorpi monoclonali) marcato con HRP in tampone TRIS-maleato con albumina di siero bovino e timolo. | Ab | HRP | 1 flacone 6 ml | Pronte per l'uso | |
| Ab | HRP | | | | |
| <table border="1" data-bbox="140 1122 260 1160"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibratore N= 0 - 5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in plasma umano con benzamidina e timolo. | CAL | N | 6 flaconi liofiliz. | Aggiungere 1 ml di acqua distillata | |
| CAL | N | | | | |
| <table border="1" data-bbox="156 1301 300 1339"> <tr> <td>DIL</td> <td>SPE</td> </tr> </table> Diluyente del Campione: plasma umano con benzamidina e timolo. | DIL | SPE | 2 flacone liofiliz. | Aggiungere acqua distillata (vedi etichetta per volumi esatti) | |
| DIL | SPE | | | | |
| <table border="1" data-bbox="156 1424 300 1462"> <tr> <td>INC</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Tampone di Incubazione: Tampone fosfato con albumina di siero bovino e timolo. | INC | BUF | 1 flacone 11 ml | Pronte per l'uso | |
| INC | BUF | | | | |
| <table border="1" data-bbox="140 1570 316 1608"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Tampone di lavaggio (TRIS HCl) | WASH | SOLN | CONC | 1 flacone 10 ml | Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico). |
| WASH | SOLN | CONC | | | |
| <table border="1" data-bbox="140 1659 292 1697"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano con timolo | CONTROL | N | 2 flaconi liofiliz. | Aggiungere 1 ml di acqua distillata | |
| CONTROL | N | | | | |
| <table border="1" data-bbox="148 1771 339 1809"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Soluzione Cromogena TMB (tetrametilbenzidina) | CHROM | TMB | CONC | 1 flacone 12 ml | Pronte per l'uso |
| CHROM | TMB | CONC | | | |
| <table border="1" data-bbox="140 1883 260 1921"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Soluzione di arresto: HCl 1.0N | STOP | SOLN | 1 flacone 12 ml | Pronto per l'uso | |
| STOP | SOLN | | | | |

Note: 1. Usare Diluyente del Campione per diluire i campioni.
2. 1 pg della preparazione standard è equivalente a 1 mU dell'NIBSC 1st IS 89/520.

VI. REATTIVI NON FORNITI

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

1. Acqua distillata di qualità elevata
2. Pipette per dispensare 50 µl, 100 µl 200 µl, 1 ml e 10 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Agitatore tipo vortex.
4. Agitatore magnetico.
5. Agitatore orizzontale per micropiastre da 700 ± 100 rpm.
6. Lavatrice per piastra di microtitolazione
7. Lettore di micropiastre per letture a 450, 490 e 650 nm (in caso di lettura policromatica) o per letture a 450 e 650 nm (in caso di lettura biromatica).

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

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

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

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

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- Prima dell'impiego, tutti i campioni devono essere a 18-25°C. Si raccomanda di vortexare i campioni prima di utilizzarli.
- Le condizioni di raccolta possono influenzare i valori. Adottare pertanto le massime precauzioni durante la raccolta per evitare che eventuali impurità contenute nei campioni possano stimolare la produzione di IL-8 da parte delle cellule ematiche con conseguente aumento falsato dei livelli sierici di IL-8.
- Le provette di raccolta devono essere apirogene. Il plasma può essere raccolto in provette sterili con EDTA e rapidamente separato dopo centrifugazione. L'utilizzo di provette contenenti eparina è sconsigliabile in considerazione della frequente contaminazione pirogenica dei lotti di eparina.

X. METODO DEL DOSAGGIO

- A. Avvertenze generali**
Non usare il kit o i suoi componenti oltre la data di scadenza.
Non mescolare reattivi di lotti diversi.
Prima dell'uso portare tutti i reattivi a 18-25°C.
Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione.
Eseguire calibratori, controlli e campioni in doppio. Si raccomanda l'allineamento verticale.
Utilizzare un contenitore di plastica pulito per preparare la soluzione di lavaggio.
Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.
Per la distribuzione della Soluzione Cromogena e la Soluzione di arresto evitare pipette con parti metalliche.
L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio.
Rispettare i tempi di incubazione.
Per evitare derive, l'intervallo tra il pipettaggio del primo calibratore e

l'ultimo campione deve essere limitato ai tempi riportati nella sezione XIII, paragrafo E (Tempo Trascorso).

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

La Soluzione Cromogena deve essere incolore. L'eventuale sviluppo di un colore blu entro pochi minuti dalla preparazione indica che il reagente è inutilizzabile e deve essere eliminato.

Distribuzione della Soluzione Cromogena entro 15 minuti dopo il lavaggio della piastra di microtitolazione.

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

B. Metodo del dosaggio

1. Selezionare il numero di strisce reagenti necessario per il test. Le strisce reagenti inutilizzate devono essere risigillate nel contenitore con un essiccante e conservate a 2-8°C.
2. Assicurare le strisce reagenti nel telaio di supporto.
3. Pipettare 100 µl di Tampone di Incubazione in ogni pozzetto
4. Pipettare 100 µl di ogni calibratore, controllo e campione nei pozzetti adeguati.
5. Pipettare 50 µl di coniugato anti-IL-8- HRP in tutti i pozzetti.
6. Incubare per 2 ore a 18-25°C su agitatore orizzontale regolato a 700 ± 100 rpm.
7. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
8. Lavare la piastra 3 volte :
 - versando 0,4 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
 - aspirando il contenuto di ogni pozzetto
9. Pipettare 100 µl della Soluzione Cromogena in ogni pozzetto entro 15 minuti dal termine della fase di lavaggio.
10. Incubare la piastra di microtitolazione per 15 minuti a 18-25°C su un agitatore orizzontale a 700 ± 100 rpm; evitare la luce diretta del sole.
11. Pipettare 100 µl di soluzione di arresto in ogni pozzetto.
12. Leggere le assorbanze a 450 nm a 490 nm (filtro di riferimento a 630 nm o 650 nm) entro 30 minuti e calcolare i risultati come descritto nella sezione XI.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

A. Lettura policromatica:

1. In questo caso, l'elaborazione dati verrà effettuata dal software.
2. La piastra viene letta a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
3. Verrà quindi effettuata una seconda lettura a 490 nm rispetto allo stesso filtro di riferimento.
4. Il Software guiderà automaticamente il lettore e integrerà le due letture utilizzando un modello policromatico. Tale tecnica può generare valori fino a 10 OD.
5. Il principio dell'elaborazione policromatica dei dati è la seguente:
 - * $X_i = OD$ a 450 nm
 - * $Y_i = OD$ a 490 nm
 - * Utilizzando una regressione lineare standard non pesata, i parametri A & B sono calcolati: $Y = A \cdot X + B$
 - * Se $X_i < 3$ unità OD, X calcolato = X_i
 - * Se $X_i > 3$ unità OD, X calcolato = $(Y_i - B) / A$
 - * Per tracciare la curva di calibrazione viene utilizzato un modello di adattamento della curva logistica a 4 parametri.
 - * La concentrazione di IL-8 nel campione viene determinata per interpolazione sulla curva di calibrazione.

B. Lettura bicromatica

1. Leggere la piastra a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
3. Costruire la curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica o lineare ponendo in ordinata le medie dei OD dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di IL-8, collegando i punti tracciati con linee rette.
4. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
5. E' possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

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

| IL-8-ELISA | | Unità OD |
|-------------|------------|-----------------------|
| | | Modello policromatico |
| Calibratore | 0 pg/ml | 0,029 |
| | 40,4 pg/ml | 0,120 |
| | 58 pg/ml | 0,164 |
| | 156 pg/ml | 0,423 |
| | 551 pg/ml | 1,350 |
| | 1845 pg/ml | 2,973 |

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Venti replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard. La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con OD pari alla media più 2 deviazioni standard di 20 replicati dello standard zero, è risultata essere 1,1 pg/ml.

B. Specificità

Nessuna reazione crociata significativa è stata osservata in presenza di 50 ng di IL-1α, IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, TNF-α, TNF-β, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, TGF-β, GM-CSF, OSM, MIP-1α, MIP-1β, LIF, MCP-1, G-CSF, RANTES, PF-4, βTG, GRO, IP-10 e SCF. Tale test per il dosaggio della IL-8 è specifico per la IL-8 naturale e ricombinante umana ed è in grado di riconoscere la IL-8 di 72 aa.

C. Precisione

| INTRA SAGGIO | | | | INTER SAGGIO | | | |
|--------------|----|------------------|--------|--------------|----|------------------|--------|
| Siero | N | <X> ± SD (pg/ml) | CV (%) | Siero | N | <X> ± SD (pg/ml) | CV (%) |
| A | 12 | 102 ± 3 | 3,2 | A | 20 | 150 ± 13 | 8,6 |
| B | 12 | 227 ± 8 | 3,6 | B | 20 | 442 ± 58 | 13,1 |

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI RECUPERO

| Campione | IL-8 aggiunta (pg/ml) | IL-8 recuperata (pg/ml) | Recupero (%) |
|----------|-----------------------|-------------------------|--------------|
| Plasma | 0 | 0 | - |
| | 61 | 65 | 105 |
| | 108 | 127 | 118 |
| | 292 | 349 | 119 |

TEST DI DILUIZIONE

| Campione | Diluzione | Concentrazione teorica (pg/ml) | Concentrazione misurata (pg/ml) |
|----------|-----------|--------------------------------|---------------------------------|
| Plasma | 1/1 | - | 678 |
| | 1/2 | 339 | 272 |
| | 1/4 | 169 | 148 |
| | 1/8 | 85 | 82 |
| | 1/16 | 42 | 40 |

I campioni sono stati diluiti con Diluente del Campione.

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

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

| campione | 0 min | 10 min | 20 min | 30 min | 40 min |
|----------|-------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | 66 | 53 | 59 | 55 | 62 |
| 2 | 118 | 114 | 111 | 108 | 113 |
| 3 | 246 | 224 | 221 | 213 | 221 |
| 4 | 914 | 906 | 905 | 882 | 855 |

D. Effetto hook

Un campione ha cui è stata aggiunta IL-8 fino a 0,5 µg/ml ha OD superiori a quello dello standard più concentrato.

XIV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

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

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

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

Come riferimento, i valori di 36 campioni di plasma EDTA appartenenti a soggetti apparentemente sani con bassi livelli di PCR sono risultati compresi nel range 0 – 132 pg/ml. Di questi, 34 hanno prodotto valori inferiori a 50 pg/ml.

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

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

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

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

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

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- MATSUHUMA K., et al. (1989). **Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line.** J. Exp. Med., 169 : 1485-1490.
- BAGGIOLINI M., et al. (1989). **Neutrophil-activating peptide-1/Interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils.** J. Clin. Invest., 84 : 1045-1049.
- HACK C., et al. (1992). **Interleukin-8 in sepsis : relation to shock and inflammatory mediators.** Infect. Immun., 60 : 2835-2842.
- TILG H., et al. (1992). **Interleukin-8 serum concentrations after liver transplantation.** Transplant, 53 : 800-803.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

| | CALIBRATORE (µl) | CAMPIONI CONTROLLI (µl) |
|---|---------------------|-------------------------------|
| Tampone di Incubazione | 100 | 100 |
| Calibratore (0 - 5) | 100 | - |
| Campioni, controlli | - | 100 |
| Coniugato anti-IL-8-HRP | 50 | 50 |
| Incubare per 2 ore a 18-25°C in agitazione continua a 700 rpm. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 400 µl di soluzione di lavaggio e aspirare. | | |
| Soluzione Cromogena | 100 | 100 |
| Incubare per 15 minuti a 18-25°C in agitazione continua a 700 rpm. | | |
| Soluzione di arresto | 100 | 100 |
| Leggere su un lettore per piastra da microtitolazione e registrare l'assorbanza di ogni pozzetto a 450 nm (e 490 nm) rispetto a 630 (o 650 nm) | | |



es

Lea todo el protocolo antes de usar.

IL-8-ELISA

I. INDICACIONES

Ensayo inmunoenzimático para la determinación cuantitativa in vitro de interleucina-8 (IL-8) en plasma.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre comercial:** DIAsource IL-8-ELISA Kit
- B. Número de catálogo:** KAP1301: 96 pruebas
- C. Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para recibir asistencia técnica o información sobre pedidos póngase en contacto con:
Tel: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. ANTECEDENTES CLÍNICOS

A. Actividades biológicas

La IL-8 (también conocida como NAP-1, péptido activador de neutrófilos) es una proteína quimioatrayente de neutrófilos. Esta citocina pertenece a una nueva familia de péptidos quimiotácticos llamados quimiocinas. Este mediador proinflamatorio es secretado por diferentes células como monocitos, neutrófilos, células endoteliales, fibroblastos tras la activación y por linfocitos T estimulados con mitógenos. La IL-8 es una citocina clave que se ha encontrado en las escamas de los pacientes de psoriasis y en el líquido sinovial de pacientes que sufren artritis reumatoide y gota. También se ha sugerido que la IL-8 participa en el reclutamiento de neutrófilos en el pulmón durante el SDRA.


B. Aplicación clínica

Se halló que el nivel de IL-8 de los pacientes con shock séptico se correlacionaba con la mortalidad, y en el rechazo agudo de injerto hepático, se observó que los niveles de IL-8 en suero aumentaron significativamente. El nivel de IL-8 en estas y otras afecciones podría ser importante para caracterizar el progreso de estas enfermedades.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El DIAsource IL-8-ELISA es un inmunoensayo enzimático de sensibilidad amplificada en fase sólida que se realiza en placa de microvaloración. El ensayo utiliza anticuerpos monoclonales (AcM) dirigidos contra distintos epítomos de la IL-8. Los calibradores y las muestras reaccionan con el anticuerpo monoclonal de captura (AcM 1) que recubre el pocillo de microvaloración y con un anticuerpo monoclonal (AcM 2) marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Tras un período de incubación que permite la formación de un sándwich: AcM 1 recubierto – IL-8 humana – AcM 2 – HRP, se lava la placa de microvaloración para eliminar el anticuerpo marcado con enzimas no unidas. El anticuerpo marcado con enzimas unidas se mide a través de una reacción cromogénica. Se añade la solución cromogénica (TMB) y se incubaba. Se detiene la reacción añadiendo solución de parada y a continuación se lee la placa de microvaloración a la longitud de onda adecuada. La cantidad de sustrato transformado se determina colorimétricamente midiendo la absorbancia, que es proporcional a la concentración de IL-8. Se representa una curva de calibración y se determina la concentración de IL-8 de las muestras mediante interpolación en la curva de calibración. El uso del lector ELISA (linealidad de hasta 3 unidades de DO) y de un método sofisticado de reducción de datos (reducción de datos policromáticos) da lugar a una sensibilidad alta en el intervalo bajo y a un intervalo de calibración extendido.

V. REACTIVOS PROPORCIONADOS

| Reactivos | Kit de 96 pruebas | Reconstitución | | | |
|---|-------------------|------------------------|------------------|---|--|
|  Placa de microtitulación (96 pocillos rompibles) pocillos recubiertos con anti IL-8 (anticuerpos monoclonales) | 96 pocillos | Listo para usar | | | |
| <table border="1" data-bbox="129 952 277 1003"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> </tr> </table> Conjugado: PHR marcado anti IL-8 (anticuerpos monoclonales) en tampón de maleato-TRIS con albúmina de suero bovino y timol | Ab | HRP | 1 vial 6 ml | Listo para usar | |
| Ab | HRP | | | | |
| <table border="1" data-bbox="124 1126 260 1167"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibrador N = 0 a 5 (véanse los valores exactos en la etiqueta del vial) en plasma humano con benzamidina y timol | CAL | N | 6 viales liofil. | Añadir 1 ml de agua destilada | |
| CAL | N | | | | |
| <table border="1" data-bbox="134 1301 288 1339"> <tr> <td>DIL</td> <td>SPE</td> </tr> </table> Diluyente de muestras: plasma humano con benzamidina y timol | DIL | SPE | 2 viales liofil. | Añadir agua destilada (véase en la etiqueta el volumen exacto) | |
| DIL | SPE | | | | |
| <table border="1" data-bbox="134 1435 260 1473"> <tr> <td>INC</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Tampón de incubación: Tampón fosfato con albúmina de suero bovino y timol | INC | BUF | 1 vial 11 ml | Listo para usar | |
| INC | BUF | | | | |
| <table border="1" data-bbox="124 1554 314 1592"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Solución de lavado (Tris-HCl) | WASH | SOLN | CONC | 1 vial 10 ml | Diluir 200 x con agua destilada (usar un agitador magnético). |
| WASH | SOLN | CONC | | | |
| <table border="1" data-bbox="124 1653 288 1691"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controles - N = 1 o 2 en plasma humano con timol | CONTROL | N | 2 viales liofil. | Añadir 1 ml de agua destilada | |
| CONTROL | N | | | | |
| <table border="1" data-bbox="108 1771 336 1816"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> </tr> </table> TMB cromogénica (tetrametilbencidina) | CHROM | TMB | 1 vial 12 ml | Listo para usar | |
| CHROM | TMB | | | | |
| <table border="1" data-bbox="102 1895 300 1939"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Solución de parada: HCl 1,0N | STOP | SOLN | 1 vial 12 ml | Listo para usar | |
| STOP | SOLN | | | | |

Nota: 1. Usar el diluyente de muestras para las diluciones.
2. 1 pg de la preparación del calibrador es equivalente a 1 mU del 1^{er} estándar internacional 89/520 del NIBSC.

VI. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

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

1. Agua destilada de alta calidad
2. Pipetas para dispensación de: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml y 10 ml (se recomienda usar pipetas de precisión con puntas de plástico desechables)
3. Agitador vórtex
4. Agitador magnético
5. Agitador de placas de microvaloración con capacidad de 700 rpm ± 100 rpm
6. Lavador de placas de microvaloración
7. Lector de placas de microvaloración con capacidad para leer a 450, 490 y 650 nm (en el caso de lectura policromática) o con capacidad para 450 y 650 nm (lectura bicromática)

VII. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

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

VIII. CONSERVACIÓN Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

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

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- Evite ciclos posteriores de congelación y descongelación.
- Antes de su uso, todas las muestras de estar a 18-25 °C. Se recomienda agitar las muestras en un vórtex antes de su uso.
- Las condiciones de obtención de las muestras pueden influir en los valores; por tanto, deben tomarse estrictas precauciones durante su recogida para evitar impurezas contenidas en los materiales de obtención de las muestras que estimulen la producción de IL-8 por las células sanguíneas y aumentar así incorrectamente los valores de IL-8 en plasma.
- Los tubos de recogida deben ser apirógenos. El plasma se puede recoger en EDTA estéril y separarlo rápidamente tras la centrifugación. Se desaconseja el uso de tubos de heparina, ya que con frecuencia los lotes de heparina están contaminados con pirógenos.

X. PROCEDIMIENTO

- A. **Notas sobre la manipulación**
No utilice el kit o sus componentes pasada la fecha de caducidad. No mezcle materiales de distintos lotes de kit. Todos los reactivos deben estar a 18-25 °C antes de usarse. Mezcle bien todos los reactivos y muestras agitándolos o revolviéndolos suavemente. Realice los calibradores, los controles y las muestras por duplicado. Se recomienda alinear verticalmente. Utilice un recipiente de plástico limpio para preparar la solución de lavado. Para evitar la contaminación cruzada, utilice una punta de pipeta desechable al añadir cada reactivo y muestra. No utilice pipetas con partes metálicas para dispensar la solución cromogénica y la solución de parada.

Las pipetas de alta precisión o un equipo de pipeteo automatizado mejorarán la precisión.

Respete los tiempos de incubación.

Para que no haya desvíos, el tiempo entre el pipeteo del primer calibrador y la última muestra debe limitarse al tiempo indicado en el apartado XIII, párrafo E (Tiempo de demora).

Prepare una curva de calibración para cada análisis, no utilice datos de análisis anteriores.

La solución cromogénica debe ser incolora. Si unos minutos después de la preparación se vuelve azul, indica que el reactivo no se puede usar y se debe desechar.

Dispense la solución cromogénica antes de transcurridos 15 minutos desde el lavado de la placa de microvaloración.

Durante la incubación con solución cromogénica, evite la luz solar directa en la placa de microvaloración.

B. Procedimiento

1. Seleccione el número necesario de tiras para el análisis. Las tiras no utilizadas deberían volverse a guardar herméticamente en la bolsa con un desecante y conservarse entre 2 y 8 °C.
2. Fije las tiras en el marco de soporte.
3. Pipetee 100 µl de tampón de incubación en todos los pocillos.
4. Pipetee 100 µl de cada calibrador, control y muestra en los pocillos adecuados.
5. Pipetee 50 µl del conjugado anti IL-8-HRP en todos los pocillos.
6. Incube durante 2 horas a 18-25 °C en un agitador horizontal configurado a 700 ± 100 rpm.
7. Aspire el líquido de cada pocillo.
8. Lave la placa 3 veces:
 - Dispensando 0,4 ml de solución de lavado en cada pocillo
 - Aspirando el contenido de cada pocillo
9. Pipetee 100 µl de la solución cromogénica en cada pocillo en los 15 minutos siguientes al paso de lavado.
10. Incube la placa de microvaloración durante 15 minutos a 18-25 °C en un agitador horizontal configurado a 700 ± 100 rpm y evite la luz solar directa.
11. Pipetee 100 µl de solución de parada en cada pocillo.
12. Lea las absorbancias a 450 y 490 nm (filtro de referencia a 630 o 650 nm) antes de 30 minutos y calcule los resultados conforme se describe en el apartado XI.

XI. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

A. Lectura policromática

1. En este caso, el software realizará el procesamiento de los datos.
2. La placa se lee primero a 450 nm con respecto a un filtro de referencia configurado a 650 nm (o 630 nm).
3. Se realiza una segunda lectura a 490 nm con respecto al mismo filtro de referencia.
4. El software controlará el lector automáticamente e integrará ambas lecturas en un modelo policromático. Esta técnica puede generar densidades ópticas (DO) de hasta 10.
5. El principio del procesamiento de datos policromáticos es el siguiente:
 - $X_i = DO$ a 450 nm
 - $Y_i = DO$ a 490 nm
 - Utilizando una regresión lineal no ponderada estándar, se calculan los parámetros A y B: $Y = A \cdot X + B$
 - Si $X_i < 3$ unidades de DO, entonces la X calculada = X_i
 - Si $X_i > 3$ unidades de DO, entonces la X calculada = $(Y_i - B)/A$
 - Se emplea un ajuste de la curva logística de 4 parámetros para generar la curva de calibración.
 - La concentración de IL-8 de las muestras se determina mediante interpolación en la curva de calibración.

B. Lectura bicromática

1. Lea la placa a 450 nm con respecto a un filtro de referencia configurado a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcule la media de las determinaciones por duplicado.
3. Represente en papel milimetrado o semilogarítmico los valores de DO (en las ordenadas) de cada calibrador en función de la concentración correspondiente de IL-8 (abscisas) y trace una curva de calibración por los puntos de los calibradores conectando los puntos con líneas rectas.
4. Lea la concentración de cada control y muestra mediante interpolación en la curva de calibración.
5. La reducción de datos con programas informáticos simplificará estos cálculos. Si se emplea un procesamiento automático de los resultados, se recomienda un ajuste de la curva mediante función logística de 4 parámetros.

XII. DATOS TÍPICOS

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

| IL-8-ELISA | | Unidades de DO Modelo policromático |
|------------|------------|--|
| Calibrador | 0 pg/ml | 0,029 |
| | 40,4 pg/ml | 0,120 |
| | 58 pg/ml | 0,164 |
| | 156 pg/ml | 0,423 |
| | 551 pg/ml | 1,350 |
| | 1845 pg/ml | 2,973 |

XIII. EFICACIA Y LIMITACIONES

A. Límite de detección

Se analizaron veinte calibradores cero junto con un conjunto de otros calibradores. El límite de detección, definido como la concentración aparente dos desviaciones estándar por encima del promedio de DO en la unión cero, fue de 1,1 pg/ml.

B. Especificidad

No se observó ninguna reacción cruzada significativa en presencia de 50 ng de IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, TNF- α , TNF- β , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TGF- β , GM-CSF, OSM, MIP-1 α , MIP-1 β , LIF, MCP-1, G-CSF, RANTES, PF-4, β TG, GRO, IP-10 y SCF. Este ensayo de IL-8 es específico para la IL-8 humana natural y recombinante, y puede reconocer la forma de 72 aminoácidos de la IL-8.

C. Precisión

| INTRAENSAYO | | | | INTERENSAYO | | | |
|-------------|----|---------------------|-----------|-------------|----|---------------------|-----------|
| Suero | N | <X> ± DE (pg/ml) | CV (%) | Suero | N | <X> ± DE (pg/ml) | CV (%) |
| A | 12 | 102 ± 3 | 3,2 | A | 20 | 150 ± 13 | 8,6 |
| B | 12 | 227 ± 8 | 3,6 | B | 20 | 442 ± 58 | 13,1 |

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

D. Exactitud

PRUEBA DE RECUPERACIÓN

| Muestra | IL-8 añadida (pg/ml) | IL-8 recuperada (pg/ml) | Recuperación (%) |
|---------|-------------------------|----------------------------|---------------------|
| Plasma | 0 | 0 | - |
| | 61 | 65 | 105 |
| | 108 | 127 | 118 |
| | 292 | 349 | 119 |

PRUEBA DE DILUCIÓN

| Muestra | Dilución | Concent. teórica (pg/ml) | Concent. medida (pg/ml) |
|---------|----------|-----------------------------|----------------------------|
| Plasma | 1/1 | - | 678 |
| | 1/2 | 339 | 272 |
| | 1/4 | 169 | 148 |
| | 1/8 | 85 | 82 |
| | 1/16 | 42 | 40 |

Las muestras se diluyeron con diluyente de muestras.

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

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

TIEMPO DE DEMORA

| Muestra | 0 min | 10 min | 20 min | 30 min | 40 min |
|---------|-------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | 66 | 53 | 59 | 55 | 62 |
| 2 | 118 | 114 | 111 | 108 | 113 |
| 3 | 246 | 224 | 221 | 213 | 221 |
| 4 | 914 | 906 | 905 | 882 | 855 |

F. Efecto gancho

Una muestra a la que se añadieron 0,5 µg/ml de IL-8 arroja una DO más alta que el punto del último calibrador.

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

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

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

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

Como guía, los resultados de 36 muestras de plasma EDTA de personas aparentemente sanas con bajos niveles de PCR se encontraron entre 0 y 132 pg/ml. De estas 36 muestras, en 34 se obtuvieron valores inferiores a 50 pg/ml.

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Solo para uso diagnóstico *in vitro*.

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

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

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

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

XVII. BIBLIOGRAFÍA

- MATSUHUMA K., et al. (1989). **Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line.** J. Exp. Med., 169 : 1485-1490.
- BAGGIOLINI M., et al. (1989). **Neutrophil-activating peptide-1/Interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils.** J. Clin. Invest., 84 : 1045-1049.
- HACK C., et al. (1992). **Interleukin-8 in sepsis : relation to shock and inflammatory mediators.** Infect. Immun., 60 : 2835-2842.
- TILG H., et al. (1992). **Interleukin-8 serum concentrations after liver transplantation.** Transplant, 53 : 800-803.

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

| | CALIBRADORES (µl) | MUESTRA(S) CONTROLES (µl) |
|--|----------------------|---------------------------------|
| Tampón de incubación | 100 | 100 |
| Calibradores (0-5) | 100 | - |
| Muestras, controles | - | 100 |
| Conjugado anti-IL-8-HRP | 50 | 50 |
| Incuba durante 2 horas a 18-25 °C con agitación continua a 700 rpm. Aspire el contenido de cada pocillo. Lave 3 veces con 400 µl de solución de lavado y aspire. | | |
| Solución cromogénica | 100 | 100 |
| Incuba durante 15 minutos a 18-25 °C con agitación continua a 700 rpm. | | |
| Solución de parada | 100 | 100 |
| Lea en un lector de placas de microvaloración y registre la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (490 nm) frente a 630 (o 650 nm). | | |

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

IL-8-ELISA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ανοσοενζυμομετρικός προσδιορισμός για την in vitro ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης ιντερλευκίνης-8 (IL-8) στο πλάσμα.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. **Εμπορική ονομασία:** Κιτ IL-8-ELISA της DIASource
- B. **Αριθμός καταλόγου:** KAP1301: 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. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Βιολογική δράση

Η IL-8 (γνωστή επίσης ως NAP-1 – πεπτίδιο ενεργοποίησης των ουδετερόφιλων) είναι μία χημειοτακτική πρωτεΐνη για τα ουδετερόφιλα. Η συγκεκριμένη κυτταροκίνη αποτελεί μέλος μίας νέας οικογένειας χημειοτακτικών πεπτιδίων με την ονομασία «χημειοκίνες». Αυτός ο προφλεγμονώδης μεσολαβητής εκκρίνεται από διάφορα κύτταρα, π.χ. μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες μετά από ενεργοποίηση και από ενεργοποιημένα από μιτογόνο T-λεμφοκύτταρα. Η IL-8 είναι μία κυτταροκίνη-κλειδί που έχει βρεθεί σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα λέπια ψωριασικών ασθενών, σε αρθρικό υγρό πασχόντων από ρευματοειδή αρθρίτιδα και ουρική αρθρίτιδα. Έχει αναφερθεί πως η IL-8 ενδεχομένως διαδραματίζει ρόλο στη στρατολόγηση ουδετερόφιλων στον πνεύμονα κατά τη διάρκεια ARDS.

B. Κλινικές εφαρμογές


Έχει φανεί πως τα επίπεδα της IL-8 σχετίζονται με τη θνησιμότητα των ασθενών σε σηπτικό σοκ, ενώ έχει αναφερθεί εκσεσημασμένη αύξηση των επιπέδων της στον ορό, σε περιπτώσεις οξείας απόρριψης ηπατικού μοσχεύματος. Τα επίπεδα της IL-8 σε αυτές και άλλες καταστάσεις ενδέχεται να αποδειχθούν σημαντικός παράγοντας στον προσδιορισμό της πορείας αυτών των κλινικών οντοτήτων.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο προσδιορισμός IL-8-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-8. Οι βαθμονομητές και τα δείγματα αντιδρούν με το μονοκλωνικό αντίσωμα σύλληψης (MAb 1) που είναι επιστραωμένο στην υποδοχή της πλάκας μικροτιτλοδότησης και με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα (MAb 2) σηματοδοτούμενο με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP). Μετά από μια περίοδο επώασης που επιτρέπει το σχηματισμό ενός σάντουιτς: επιστραωμένο MAb 1 – ανθρώπινη IL-8 – MAb 2 – HRP, η πλάκα μικροτιτλοδότησης υποβάλλεται σε πλύση για να απομακρυνθεί το σηματοδοτούμενο με ένζυμο αντίσωμα. Το σηματοδοτούμενο με ένζυμο δεσμευμένο αντίσωμα μετράται μέσω μιας χρωμογόνου αντίδρασης. Προστίθεται και επωάζεται χρωμογόνο διάλυμα (TMB έτοιμο για χρήση). Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη ανασχετικού διαλύματος και στη συνέχεια γίνεται ανάγνωση της πλάκας μικροτιτλοδότησης στο κατάλληλο μήκος κύματος. Η ποσότητα μετατροπής του υποστρώματος καθορίζεται χρωματομετρικά μετράοντας την απορρόφηση, η οποία είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση της IL-8.

Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζεται η συγκέντρωση της IL-8 στα δείγματα με αναγωγή από την καμπύλη βαθμονόμησης. Η χρήση του συστήματος ανάγνωσης ELISA (γραμμικότητα έως 3 μονάδες OD) και μιας πολύπλοκης μεθόδου αναγωγής δεδομένων (αναγωγή πολυχρωματικών δεδομένων) έχουν ως αποτέλεσμα υψηλή ευαισθησία στο χαμηλό πεδίο τιμών και στο εκτεταμένο πεδίο τιμών βαθμονόμησης.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

| Αντιδραστήρια | Κιτ 96 προσδιορισμών | Ανασύσταση | | | |
|--|----------------------|------------------|-----------------------------|---|---|
|  Πλάκα μικροτιτλοδότησης (96 σπασίματα φρεατίων) επικαλυμμένα φρεάτια anti IL-8 (μονοκλωνικά αντισώματα) | 96 υποδοχές | Έτοιμο για χρήση | | | |
| <table border="1" data-bbox="145 1077 293 1128"><tr><td>Ab</td><td>HRP</td></tr></table> Σύζευγμα: Αντι-IL-8 (μονοκλωνικά αντισώματα) σηματοδοτούμενα με HRP σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-μηλικών με βόεια ορολευκοματίνη και θυμόλη | Ab | HRP | 1 φιαλίδιο 6 ml | Έτοιμο για χρήση | |
| Ab | HRP | | | | |
| <table border="1" data-bbox="140 1290 276 1323"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Βαθμονομητής N = 0 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο πλάσμα με βενζαμιδίνη και θυμόλη | CAL | N | 6 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο | Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού | |
| CAL | N | | | | |
| <table border="1" data-bbox="150 1509 304 1543"><tr><td>DIL</td><td>SPE</td></tr></table> Διάλυμα αραιώσης δειγμάτων: σε ανθρώπινο πλάσμα με βενζαμιδίνη και θυμόλη | DIL | SPE | 2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο | Προσθέστε απεσταγμένο νερό (βλ. ετικέτα στο φιαλίδιο για τον ακριβή όγκο) | |
| DIL | SPE | | | | |
| <table border="1" data-bbox="150 1675 276 1709"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βόεια ορολευκοματίνη και θυμόλη | INC | BUF | 1 φιαλίδιο 11 ml | Έτοιμο για χρήση | |
| INC | BUF | | | | |
| <table border="1" data-bbox="140 1850 328 1883"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Διάλυμα πλύσης (Tris-HCl) | WASH | SOLN | CONC | 1 φιαλίδιο 10 ml | Αραιώστε 200 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα). |
| WASH | SOLN | CONC | | | |
| <table border="1" data-bbox="140 1989 304 2022"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο πλάσμα με θυμόλη | CONTROL | N | 2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο. | Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού | |
| CONTROL | N | | | | |

| | | | | |
|--|-------|------|------------------|------------------|
| <table border="1" data-bbox="903 147 1139 197"><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table> Χρωμογόνο TMB (Τετραμεθυλβενζυδίνη) | CHROM | TMB | 1 φιαλίδιο 12 ml | Έτοιμο για χρήση |
| CHROM | TMB | | | |
| <table border="1" data-bbox="927 353 1123 403"><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> Ανασχετικό διάλυμα: HCl 1,0N | STOP | SOLN | 1 φιαλίδιο 12 ml | Έτοιμο για χρήση |
| STOP | SOLN | | | |

Σημείωση: 1. Χρησιμοποιήστε διάλυμα αραιώσης δειγμάτων για αραιώση των δειγμάτων.

2. 1 pg του παρασκευάσματος του βαθμονομητή είναι ισοδύναμο με 1 mU του NIBSC 1° IS 89/520

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

1. Απεσταγμένο νερό υψηλής ποιότητας
2. Πιπέτες για διανομή: 50 μl, 100 μl, 200 μl, 1 ml και 10 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
3. Αναμεικτης στροβιλισμού
4. Μαγνητικός αναδευτήρας
5. Οριζόντια συσκευή ανάδευσης πλακών μικροτιτλοδότησης με δυνατότητα 700 rpm ± 100 rpm
6. Συσκευή πλύσης για πλάκες μικροτιτλοδότησης
7. Συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης με δυνατότητα ανάγνωσης στα 450 nm, 490 nm και 650 nm (σε περίπτωση πολυχρωματικής ανάγνωσης) ή με δυνατότητα ανάγνωσης στα 450 nm και 650 nm (διχρωματική ανάγνωση)

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

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

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8°C.
- Οι μη χρησιμοποιημένες ταινίες πρέπει να φυλάσσονται στους 2-8°C, σε σφραγισμένη σακούλα που περιέχει αποξηραντικό παράγοντα, μέχρι την ημερομηνία λήξης.
- Μετά την ανασύσταση, οι βαθμονομητές, οι οροί ελέγχου και το διάλυμα αραιώσης δειγμάτων παραμένουν 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 απόψυξης-κατάψυξης.
- Το συμποκνωμένο διάλυμα πλύσης είναι σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την ημερομηνία λήξης.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, το σύζευγμα παραμένει σταθερό έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8°C.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Φέρετε όλα τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Συνιστάται η ανάμειξη των δειγμάτων σε συσκευή στροβιλισμού πριν από τη χρήση.
- Οι συνθήκες δειγματοληψίας μπορούν να επηρεάσουν τις τιμές. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να λαμβάνονται αυστηρά μέτρα προφύλαξης κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας για την αποφυγή προσμίξεων στα δείγματα λήψης, τα οποία θα διέγειραν την παραγωγή IL-8 από αμοκύτταρα και θα αύξαναν εσφαλμένα τις τιμές της IL-8 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 φυγοκέντρωση. Δεν συνιστάται η χρήση σωληναρίων ηπαρίνης, διότι συχνά οι παρτίδες ηπαρίνης είναι επιμολυμένες με πυρετογόνα.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό

Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης.

Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ.

Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.

Αναμειξτε 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 E (Μεσοδιάστημα).

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

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

Διανείμετε το Αποκαλυπτικό Διάλυμα εντός 15 λεπτών από την πλύση της πλάκας μικροτιλοδότησης.

Κατά τη διάρκεια επώασης με το Αποκαλυπτικό Διάλυμα, αποφύγετε την έκθεση της πλάκας μικροτιλοδότησης 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 πλαίσιο στήριξης
- Διανείμετε με πιπέτα 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος επώασης σε όλες τις υποδοχές.
- Διανείμετε με πιπέτα 100 μl από κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα στις κατάλληλες υποδοχές.
- Διανείμετε με πιπέτα 50 μl συζεύγματος αντι-IL-8 μέσα σε όλες τις υποδοχές.
- Επώαστε επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου επάνω σε οριζόντιο αναδευτήρα, ρυθμισμένο στις 700 rpm ± 100 rpm.
- Αναρροφήστε το υγρό από κάθε υποδοχή.
- Πλύνετε την πλάκα 3 φορές:
 - διανέοντας 0,4 ml διαλύματος πλύσης σε κάθε υποδοχή.
 - αναρροφώντας το περιεχόμενο κάθε υποδοχής
- Διανείμετε με πιπέτα 100 μl του αποκαλυπτικού διαλύματος σε κάθε υποδοχή, εντός 15 λεπτών από το βήμα πλύσης.
- Επώαστε την πλάκα μικροτιλοδότησης επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου 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 30 λεπτών 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).
- Εκτελείται 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 ως εξής:
 - $X_i = OD$ στα 450 nm
 - $Y_i = OD$ στα 490 nm
 - Χρησιμοποιώντας τυπική μη σταθμισμένη γραμμική παλινδρόμηση, υπολογίζονται οι παράμετροι A & B: $Y = A \cdot X + B$
 - Αν $X_i < 3$ μονάδες OD, τότε υπολογισθέν $X = X_i$
 - Αν $X_i > 3$ μονάδες OD, τότε υπολογισθέν $X = (Y_i - B) / A$
 - Χρησιμοποιείται προσαρμογή λογιστικής καμπύλης 4 παραμέτρων για τη δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης.
 - Η συγκέντρωση IL-8 στα δείγματα καθορίζεται μέσω αναγωγής στην καμπύλη βαθμονόμησης.

B. Διχρωματική 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-8 (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-8-ELISA | | Μονάδες OD Πολυχρωματικό μοντέλο |
|--------------|------------|-------------------------------------|
| Βαθμονομητής | 0 pg/ml | 0,029 |
| | 40,4 pg/ml | 0,120 |
| | 58 pg/ml | 0,164 |
| | 156 pg/ml | 0,423 |
| | 551 pg/ml | 1,350 |
| | 1845 pg/ml | 2,973 |

XIII. ΑΠΟΛΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

Μετρήθηκαν είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεις OD σε μηδενική δέσμευση, ήταν 1,1 pg/ml.

B. Ειδικότητα

Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διασταυρούμενη αντίδραση παρουσία 50 ng IL-1α, IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, TNF-α, TNF-β, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, TGF-β, GM-CSF, OSM, MIP-1α, MIP-1β, LIF, MCP-1, G-CSF, RANTES, PF-4, βTG, GRO, IP-10 and SCF. Ο παρών προσδιορισμός IL-8 είναι ειδικός για την ανθρώπινη, φυσική και ανασυνδυασμένη IL-8 και μπορεί να αναγνωρίσει τη μορφή 72 a.a. της IL-8.

C. Ακρίβεια

| ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ | | | | ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ | | | |
|---------------------------|----|--------------------|----------|-----------------------------------|----|--------------------|----------|
| Ορός | N | <X> ± T.A. (pg/ml) | Σ.Δ. (%) | Ορός | N | <X> ± T.A. (pg/ml) | Σ.Δ. (%) |
| A | 12 | 102 ± 3 | 3,2 | A | 20 | 150 ± 13 | 8,6 |
| B | 12 | 227 ± 8 | 3,6 | B | 20 | 442 ± 58 | 13,1 |

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

D. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

| Δείγμα | Προσθεθείσα IL-8 (pg/ml) | Ανακτηθείσα IL-8 (pg/ml) | Ανάκτηση (%) |
|--------|--------------------------|--------------------------|--------------|
| Πλάσμα | 0 | 0 | - |
| | 61 | 65 | 105 |
| | 108 | 127 | 118 |
| | 292 | 349 | 119 |

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

| Δείγμα | Αραίωση | Θεωρητική συγκέντρωση (pg/ml) | Μετρηθείσα συγκέντρωση (pg/ml) |
|--------|---------|-------------------------------|--------------------------------|
| Πλάσμα | 1/1 | - | 678 |
| | 1/2 | 339 | 272 |
| | 1/4 | 169 | 148 |
| | 1/8 | 85 | 82 |
| | 1/16 | 42 | 40 |

Τα δείγματα αραιώθηκαν με διάλυμα αραιώσεως δειγμάτων.

E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

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

ΧΡΟΝΙΚΗ ΚΑΘΥΣΤΕΡΗΣΗ

| Δείγμα | 0 λεπτά | 10 λεπτά | 20 λεπτά | 30 λεπτά | 40 λεπτά |
|--------|---------|----------|----------|----------|----------|
| 1 | 66 | 53 | 59 | 55 | 62 |
| 2 | 118 | 114 | 111 | 108 | 113 |
| 3 | 246 | 224 | 221 | 213 | 221 |
| 4 | 914 | 906 | 905 | 882 | 855 |

F. Φαινόμενο αγκίστρου (hook)

Δείγμα που εμβολιάστηκε με IL-8 έως 0,5 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 φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα 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. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

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

Ως καθοδήγηση, τα αποτελέσματα 36 δειγμάτων πλάσματος EDTA από εμφανώς υγιή άτομα με χαμηλά επίπεδα CRP, κυμάνθηκαν μεταξύ 0 και 132 pg/ml. Οι τιμές 34 από αυτά τα δείγματα ήταν κάτω από 50 pg/ml.

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλειας

Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

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

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

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

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

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- MATSUHUMA K., et al. (1989).
Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line.
J. Exp. Med., 169 : 1485-1490.
- BAGGIOLINI M., et al. (1989).
Neutrophil-activating peptide-1/Interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils.
J. Clin. Invest., 84 : 1045-1049.
- HACK C., et al. (1992).
Interleukin-8 in sepsis : relation to shock and inflammatory mediators.
Infect. Immun., 60 : 2835-2842.
- TILG H., et al. (1992).
Interleukin-8 serum concentrations after liver transplantation.
Transplant, 53 : 800-803.

ΧVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

| | ΒΑΘΜΟΝΟΜΗ- ΤΕΣ (μl) | ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ (μl) |
|---|------------------------------------|---|
| Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης | 100 | 100 |
| Βαθμονομητές (0-5) | 100 | - |
| Δείγματα, οροί ελέγχου | - | 100 |
| Σύζευγμα αντι-IL-8-HRP | 50 | 50 |
| Επώαστε επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση στις 700 rpm). Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε υποδοχής. Πλύνετε 3 φορές με 400 μl διαλύματος πλύσης και αναρροφήστε. | | |
| Αποκαλυπτικό Διάλυμα | 100 | 100 |
| Επώαστε επί 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση στις 700 rpm. | | |
| Ανασχετικό διάλυμα | 100 | 100 |
| Διαβάστε σε συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης και καταγράψτε την απορρόφηση κάθε υποδοχής στα 450 nm (και 490 nm) έναντι 630 (ή 650 nm) | | |