



IL-6-ELISA

KAP1261

Read entire protocol before use.

IL-6-EASIA

I. INTENDED USE

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

II. GENERAL INFORMATION

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

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

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological activities

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

B. Clinical application

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

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

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

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

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 tests Kit	Color Code	Reconstitution			
 Microtiterplate with 96 anti IL-6 (monoclonal antibodies) coated wells	96 wells	blue	Ready for use			
<table><tr><td>Ab</td><td>HRP</td></tr></table> Conjugate: HRP labelled anti-IL-6 (monoclonal antibodies) in Borate buffer with bovine serum albumin and thymol	Ab	HRP	1 vial 11 ml	red	Ready for use	
Ab	HRP					
<table><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrator N = 0 to 5 (see exact values on vial labels) in human plasma with bovine serum albumin, benzamidine and thymol	CAL	N	6 vials lyophil.	yellow	Add 1 ml distilled water	
CAL	N					
<table><tr><td>DIL</td><td>SPE</td></tr></table> Specimen Diluent: human plasma with bovine serum albumin, benzamidine and thymol	DIL	SPE	3 vials lyophil.	black	Add distilled water (see on the label for the exact volume)	
DIL	SPE					
<table><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Incubation buffer: Borate buffer with bovine serum albumin, benzamidine and thymol	INC	BUF	1 vial 11 ml	black	Ready for use	
INC	BUF					
<table><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wash Solution (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	brown	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC				
<table><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controls - N = 1 or 2 in human plasma with thymol	CONTROL	N	2 vials lyophil.	silver	Add 1 ml distilled water	
CONTROL	N					
<table><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table> Chromogenic TMB Solution	CHROM	TMB	1 vial 25 ml	white	Ready for use	
CHROM	TMB					
<table><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> Stop Solution: HCl 2N	STOP	SOLN	1 vial 25 ml	white	Ready for use	
STOP	SOLN					

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

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

- 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)
- Optional equipment: The ELISA-AID™ necessary to read the plate according to polychromatic reading (see paragraph XIA.) can be purchased from Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators:** Reconstitute the 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 room temperature until expiration date.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, the conjugate is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

X. PROCEDURE

- Handling notes**
Do not use the kit or components beyond expiry date.
Do not mix materials from different kit lots.
Bring all the reagents to room temperature prior to use.
Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
Use a clean plastic container to prepare the Wash Solution.
In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
For the dispensing of the Chromogenic Solution and the Stop Solution avoid pipettes with metal parts.
High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
Respect the incubation times.
To avoid drift, the time between pipetting of the first calibrator and the last sample must be limited to the time mentioned in section XIII paragraph E (Time delay).

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

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

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

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 50 µl of Incubation Buffer into all the wells
- Pipette 100 µl of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
- Incubate for 1 hour at room temperature 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 anti-IL-6-HRP conjugate and 50 µl specimen diluent into all the wells.
- Incubate for 1 hour at room temperature 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 200 µl of the Chromogenic Solution into each well within 15 minutes following the washing step.
- Incubate the microtiterplate for 15 minutes at room temperature 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 3 hours and calculate the results as described in section XI.

XI. CALCULATION OF RESULTS

A. Polychromatic Reading:

- In this case, the ELISA-AID™ 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 ELISA-AID™ Software will drive the reader automatically and will integrate both readings into a polychromatic model. This technique can generate OD's up to 10.
- 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-6 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-6 (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-6-EASIA		OD units Polychromatic model
Calibrator	0 pg/ml	79
	23.3 pg/ml	125
	68 pg/ml	193
	201 pg/ml	408
	633 pg/ml	1036
	2560 pg/ml	3579

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection Limit

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

B. Specificity

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

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

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

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

No interference was observed.

C. Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	20	147 ± 6,1	4.2	A	20	114 ± 5	4.4
B	20	623 ± 27	4.3	B	20	270 ± 15	5.4

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST

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

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (pg/ml)	Measured Concent. (pg/ml)
Serum	1/1	-	966
	1/2	483	478
	1/4	241.5	247
	1/8	120.8	130
	1/16	60.4	54
	1/32	30	23

Samples were diluted with Specimen Diluent.

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

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

TIME DELAY

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

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

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

XV. REFERENCE INTERVALS

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

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

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

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

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

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

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

XVII. BIBLIOGRAPHY

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

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

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

DIAsource Catalogue Nr : KAP1261	P.I. Number : 1700582/en	Revision nr : 161115/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Revision date : 2016-11-15

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

IL-6-EASIA

I. VERWENDUNGSZWECK

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

II. ALLGEMEINE INFORMATION

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

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel.: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Biologische Aktivität

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

B. Klinische Anwendung

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

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DIASource IL-6-EASIA ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay (EASIA) im Mikrotiterplattenformat. Der Assay benutzt monoklonale Antikörper (MAk), die gegen verschiedene Epitope von IL-6 gerichtet sind. Kalibratoren und Proben reagieren mit dem primären monoklonalen Antikörper (MAk 1), mit dem die Wells der Mikrotiterplatte beschichtet sind, und mit einem monoklonalen Antikörper (MAk 2), der mit Meerrettich-Peroxidase (MRP) markiert ist. Nach einer Inkubationsphase bildet sich ein Sandwich-Komplex: MAk 1 - IL-6 - MAk 2 - MRP; nicht gebundene enzymbeschriebene Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Gebundene enzymbeschriebene Antikörper werden durch eine Farbreaktion gemessen. Chromogenen Lösung (TMB) wird hinzugefügt und inkubiert. Die Reaktion wird durch Hinzufügen einer Stopplösung beendet und die Mikrotiterplatte wird bei adäquater Wellenlänge ausgewertet. Die Menge an Substratumsatz wird kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die proportional zur IL-6-Konzentration ist. Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die IL-6-Konzentration in den Proben wird durch Interpolation von der Kalibrationskurve bestimmt. Die Verwendung des EASIA-Lesegeräts (Linearität bis zu 3 OD-Einheiten) und eine komplexe Datenreduktionsmethode (polychromatische Datenreduktion) ergeben eine hohe Sensibilität im niedrigen Bereich und einen breiten Kalibrationsbereich.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Tests Kit	Farbe Code	Rekonstitution
 Mikrotiterplatte mit 96 anti IL-6- beschichtete Wells (monoklonale Antikörper)	96 Wells	Blau	gebrauchsfertig
Ab HRP Konjugat: MRP beschriebene anti-IL-6 (monoklonaler Antikörper) in Boratpuffer mit Rinderserumalbumin und Thymol	1 Gefäß 11 ml	Rot	gebrauchsfertig
CAL N Kalibrator N = 0 bis 5 (genaue Werte auf Gefäßetiketten) in Humanplasma mit Rinderserumalbumin und Thymol	6 Gefäße lyophil.	Gelb	1 ml destilliertes Wasser zugeben
DIL SPE Probenverdünner: Humanplasma mit Rinderserumalbumin, Benzamidin und Thymol	3 Gefäße lyophil.	Schwarz	Dest. Wasser zugeben (das exakte Volumen bitte dem Etikett entnehmen)
INC BUF Inkubationspuffer: Boratpuffer mit Rinderserumalbumin, Benzamidin und Thymol	1 Gefäß 11 ml	Schwarz	gebrauchsfertig
WASH SOLN CONC Waschlösung (Tris-HCl)	1 Gefäß 10 ml	Braun	200 x mit destilliertem Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
CONTROL N Kontrollen - N = 1 oder 2 in Humanplasma mit Thymol	2 Gefäße lyophil.	Silber	1 ml destilliertes Wasser zugeben
CHROM TMB Chromogene TMB-Lösung	1 Gefäß 25 ml	Weiß	gebrauchsfertig
STOP SOLN Stopplösung: HCL 2N	1 Gefäß 25 ml	Weiß	gebrauchsfertig

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

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

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

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

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

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

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

X. DURCHFÜHRUNG

- A. **Bemerkungen zur Durchführung**
- Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach dem Ablaufdatum.
- Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur. Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.
- Führen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben doppelt aus. Vertikale Ausrichtung wird empfohlen.

Verwenden Sie zur Zubereitung der Waschlösung einen reinen Kunststoffbehälter.
Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
Verwenden Sie zur Pipettierung der chromogenen Lösung und der Stopplösung keine Pipetten mit Metallteilen.
Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.
Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.
Zur Vermeidung von Drift muss die Zeit zwischen dem Pipettieren des ersten Kalibrators und der letzten Probe auf die Zeit beschränkt werden, die in Abschnitt XIII Absatz E (Zeitverzögerung) erwähnt wird.
Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.
Pipettieren Sie die chromogene Lösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte.
Während der Inkubation mit der chromogenen Lösung ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

B. Durchführung

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

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

A. Polychromatische Auswertung

- In diesem Fall werden die Daten durch die ELISA-AID™ Software verarbeitet.
- Die Platte wird zunächst bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) ausgewertet.
- Eine zweite Auswertung erfolgt bei 490 nm gegen denselben Referenzfilter.
- Die ELISA-AID™ Software steuert das Lesegerät automatisch und integriert beide Auswertungen in ein polychromatisches Modell. Diese Technik kann ODs bis 10 erstellen.
- Das Prinzip der polychromatischen Datenauswertung funktioniert wie folgt:
 - X_i = OD bei 450 nm
 - Y_i = OD bei 490 nm
 - Standard nicht gewichtet lineare Regression, Parameter A & B werden berechnet: $Y = A \cdot X + B$
 - Wenn $X_i < 3$ OD Einheiten, dann X berechnet = X_i
 - Wenn $X_i > 3$ OD Einheiten, dann X berechnet = $(Y_i - B) / A$
 - Die Kalibrationskurve wird unter Verwendung einer 4 Parameter logistischen Kurve erstellt.
 - Die IL-6-Konzentration in den Proben wird durch Interpolation auf der Kalibrationskurve bestimmt.

B. Bichromatische Auswertung

- Werten Sie die Platte bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) aus.
- Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
- Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier die OD-Werte (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende IL-6 Konzentration (Abszisse) ein und zeichnen Sie eine Kalibrationskurve

durch die Kalibrationspunkte, indem Sie die eingetragenen Punkte durch gerade Linien verbinden.

- Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Kalibrationskurve.
- Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer “4 Parameter”-Kurvenfunktion.

XII. TYPISCHE WERTE

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

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

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

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

B. Spezifität

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

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

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

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

Es wurde keine Interferenz festgestellt.

C. Präzision

INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	20	147 ± 6,1	4,2	A	20	114 ± 5	4,4
B	20	623 ± 27	4,3	B	20	270 ± 15	5,4

SD: Standardabweichung, CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

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

VERDÜNNUNGSTEST

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

Die Proben wurden mit Probenverdünner verdünnt.

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

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

Zeitdifferenz

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

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

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

XV. REFERENZINTERVALLE

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

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

XVI. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

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

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde.

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

Vermeiden Sie Hautkontakt mit allen Reagenzien; Stopplösung enthält H₂SO₄, Farblösung enthält TMB in Dimethylformamid, Substratpuffer enthält H₂O₂. Bei Kontakt gründlich mit Wasser spülen.

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

XVII. LITERATUR

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

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

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

DIAsource Katalognummer: KAP1261	Beipackzettelnummer: 1700582/de	Nummer der Originalausgabe: 161115/1
-------------------------------------	------------------------------------	---

Revisionsdatum: 2016-11-15

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

IL-6-EASIA

I. USO DEL KIT

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

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

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

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche

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

B. Applicazione clinica

Mentre nella maggior parte dei soggetti normali di controllo i livelli sierici di IL-6 sono indeterminabili, nei soggetti che presentano gravi condizioni infiammatorie quali una setticemia sono rilevabili ingenti quantità di IL-6. L'incremento dei livelli sierici di IL-6 precede quello delle proteine della fase acuta, es. nella fase post-operatoria, e può essere pertanto considerato un parametro sensibile e precoce, utile alla valutazione di uno stato infiammatorio. La presenza di IL-6 nel siero è stata già descritta in associazione a danno tissutale chirurgico o traumatico, malattie infettive o autoimmuni come l'artrite, rigetto di trapianto, cirrosi epatica alcolica, neoplasie maligne ecc.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

DIAsource IL-6-EASIA 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-6. I calibratori e i campioni reagiscono con la cattura dell'anticorpo monoclonale (Mab 1) che riveste il pozzetto di microtitolazione e con un anticorpo monoclonale (Mab 2) marcato con horseradish perossidasi (HRP). Dopo un periodo di incubazione che consenta la formazione di un sandwich: Mab 1 di rivestimento –IL-6 umana – Mab 2 – HRP, la piastra di microtitolazione viene lavata per rimuovere l'anticorpo marcato con enzima non legato. L'anticorpo marcato con enzima non legato viene misurato attraverso una reazione cromogenica. Si procede quindi con l'aggiunta della soluzione cromogena (TMB) e successiva incubazione. La reazione viene interrotta con l'aggiunta di Soluzione di arresto; quindi la piastra di microtitolazione viene letta alla lunghezza d'onda adeguata. La quantità di turnover del substrato viene determinata colorimetricamente misurando l'assorbanza che è proporzionale alla concentrazione di IL-6. Viene tracciata una curva di calibrazione e la concentrazione IL-6 nei campioni viene determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione. L'utilizzo del lettore EASIA (linearità fino a 3 unità OD) associato all'impiego di un sofisticato metodo di riduzione dati (riduzione dati policromatica) garantisce un'elevata sensibilità nel range basso dei valori e un esteso range di calibrazione.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione
 Piastra di microtitolazione con 96 pozzetti , rivestiti anti IL-6 (anticorpi monoclonali)	96 pozzetti	Blu	Pronte per l'uso
Ab HRP Coniugato: anti-IL-6 (anticorpi monoclonali) marcato con HRP in tampone borato con albumina di siero bovino e timolo	1 flacone 11 ml	Rosso	Pronte per l'uso
CAL N Calibratore N= 0-5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in plasma umano con albumina di siero bovino, benzamidina e timolo	6 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
DIL SPE Diluente del Campione: plasma umano con albumina di siero bovino, benzamidina e timolo.	3 flaconi liofiliz.	nero	Aggiungere acqua distillata (vedi etichetta per volumi esatti)
INC BUF Tampone di Incubazione: Tampone borato con albumina di siero bovino, benzamidina e timolo.	1 flacone 11 ml	nero	Pronte per l'uso
WASH SOLN CONC Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	1 flacone 10 ml	Bruno	Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico)..
CONTROL N Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano con timolo	2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
CHROM TMB Soluzione Cromogena TMB	1 flacone 25 ml	Bianco	Pronto per l'uso
STOP SOLN Soluzione di arresto: HCl 2N	1 flacone 25 ml	Bianco	Pronto per l'uso

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

VI. REATTIVI NON FORNITI

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

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

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. **Calibratore:** Ricostituire i calibratori con 1 ml di acqua distillata.
- B. **Controlli:** Ricostituire i controlli con 1 ml di acqua distillata.
- C. **Diluente del Campione:** Ricostituire il Diluente 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 Diluente del Campione sono stabili 4 giorni a 2-8°C. Per periodi di conservazione molto lunghi, preparare e mantenere le aliquote a -20°C per un massimo di 2 mesi.. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- La soluzione di lavaggio concentrata è stabile a temperatura ambiente fino alla data di scadenza.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il coniugato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

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

X. METODO DEL DOSAGGIO

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

Per evitare derive, l'intervallo tra il pipettaggio del primo calibratore e l'ultimo campione deve essere limitato ai tempi riportati nella sezione XIII, paragrafo E (Tempo Trascorso).
Allestire una curva di calibrazione per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di calibrazione di sedute analitiche precedenti.
Distribuzione della soluzione cromogena entro 15 minuti dopo il lavaggio della piastra di microtitolazione.
Durante l'incubazione con la soluzione cromogena evitare la luce diretta del sole sulla piastra di microtitolazione.

B. Metodo del dosaggio

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

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

A. Lettura policromatica:

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

B. Lettura bicromatica

1. Leggere la piastra a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcolare la media delle determinazioni in 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-6, 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-6-EASIA		Unità OD
		Modello policromatico
Calibratore	0 pg/ml	79
	23,3 pg/ml	125
	68 pg/ml	193
	201 pg/ml	408
	633 pg/ml	1036
	2560 pg/ml	3579

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

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

B. Specificità

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

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

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

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

Non è stata osservata alcuna interferenza.

C. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	20	147 ± 6,1	4,2	A	20	114 ± 5	4,4
B	20	623 ± 27	4,3	B	20	270 ± 15	5,4

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI RECUPERO

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

TEST DI DILUIZIONE

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

I campioni sono stati diluiti con Diluente del Campione.

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

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

XIV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

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

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

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

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

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza
Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.
I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.
Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.
Evitare qualsiasi contatto della cute con tutti i reagenti, la soluzione di Arresto contiene HCl. In caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua.
Non fumare, bere, mangiare o applicare cosmetici nell'area di lavoro. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Utilizzare indumenti protettivi e guanti monouso.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1.

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

2.

MOSCOVITZ H. et al., (1994)
Plasma cytokine determination in emergency department patients as predictor of bacteremia and infectious disease severity.
Critical care Medicine, 22:1102-1107.

3.

SAKAMOTO K. et al., (1994)
Elevation of circulating interleukin 6 after surgery : factors influencing the serum level.
Cytokine, 6:181-186.

4.

KITA Y. et al., (1994)
Evaluation of sequential serum interleukin-6 levels in liver allograft recipients.
Transplantation, 57:1037-1041.

5.

LE MOINE O. et al., (1994)
Interleukin-6 : an early marker of bacterial infection in decompensated cirrhosis.
J. of Hepatology, 20:819-824.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	CALIBRATORE (µl)	CAMPIONI CONTROLLI (µl)
Tampone di Incubazione Calibratore (0 - 5) Campioni, controlli	50 100 -	50 - 100
Incubare per 1 ora a temperatura ambiente in agitazione continua a 700 rpm. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 400 µl di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Coniugato anti-IL-6-HRP Diluyente del Campione	100 50	100 50
Incubare per 1 ora a temperatura ambiente 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	200	200
Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente 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)		

Numero di catalogo di DIAsource: KAP1261	P.I. numero: 1700582/it	Revisione numero: 161115/1
--	----------------------------	-------------------------------

Lea todo el protocolo antes de usar.

IL-6-EASIA

I. INDICACIONES

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

II. INFORMACIÓN GENERAL

A. Nombre comercial: Kit DIAsource IL-6-EASIA

B. Número de catálogo: KAP1261: 96 pruebas

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

Para recibir asistencia técnica o información sobre pedidos contacte con:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. ANTECEDENTES CLÍNICOS

A. Actividades biológicas

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

B. Aplicación clínica

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

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

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El DIAsource IL-6-EASIA 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-6. Los calibradores y las muestras reaccionan con el anticuerpo monoclonal de captura (AcM 1) que recubre el pocillo de microvaloración y con un anticuerpo monoclonal (AcM 2) marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Tras un período de incubación que permite la formación de un sándwich:

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

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

V. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Reactivos	Kit de 96 pruebas	Código de color	Reconstitución			
 Placa de microvaloración de 96 pocillos recubiertos con anti-IL-6	96 pocillos	azul	Lista para usar			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>HRP</td></tr></table> Conjugado: anti-IL-6 (anticuerpos monoclonales) marcada con HRP en tampón de borato con albúmina de suero bovino y timol	Ab	HRP	1 vial 11 ml	rojo	Listo para usar	
Ab	HRP					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrador N = 0 a 5 (véanse los valores exactos en las etiquetas del vial) en plasma humano con albúmina de suero bovino, benzamidina y timol	CAL	N	6 viales liofil.	amarillo	Añadir 1 ml de agua destilada	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>DIL</td><td>SPE</td></tr></table> Diluyente de muestras: plasma humano con albúmina de suero bovino, benzamidina y timol	DIL	SPE	3 viales liofil.	negro	Añadir agua destilada (véase en la etiqueta el volumen exacto)	
DIL	SPE					
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Tampón de incubación: tampón de borato con albúmina de suero bovino, benzamidina y timol	INC	BUF	1 vial 11 ml	negro	Listo para usar	
INC	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solución de lavado (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 200 x con agua destilada (usar un agitador magnético)
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controles - N = 1 o 2 en plasma humano con timol	CONTROL	N	2 viales liofil.	plata	Añadir 1 ml de agua destilada	
CONTROL	N					
<table border="1"><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table> Solución de TMB cromogénica	CHROM	TMB	1 vial 25 ml	blanco	Lista para usar	
CHROM	TMB					
<table border="1"><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> Solución de parada: HCl 2N	STOP	SOLN	1 vial 25 ml	blanco	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 100 mIU del 1^{er} estándar internacional 89/548 del NIBSC.

VI. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

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

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

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

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

X. PROCEDIMIENTO

- A. **Notas sobre la manipulación**
No utilice el kit o sus componentes pasada la fecha de caducidad.
No mezcle materiales de distintos lotes de kit.
Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de usar.
Mezcle bien todos los reactivos y muestras agitándolos o revolviéndolos suavemente.
Realice los calibradores, los controles y las muestras por duplicado. Se recomienda alinear verticalmente.
Utilice un recipiente de plástico limpio para preparar la solución de lavado.

Para prevenir que se produzca contaminación cruzada, utilice una punta de pipeta desechable al añadir cada reactivo y muestra.

No utilice pipetas con partes metálicas para dispensar la solución cromogénica y la solución de parada.

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

Respete los tiempos de incubación.

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

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

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

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

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 50 µl de tampón de incubación en todos los pocillos.
4. Pipetee 100 µl de cada calibrador, control y muestra en los pocillos adecuados.
5. Incube durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador horizontal configurado a 700 ± 100 rpm.
6. Aspire el líquido de cada pocillo.
7. Lave la placa 3 veces:
 - Dispensando 0,4 ml de solución de lavado en cada pocillo
 - Aspirando el contenido de cada pocillo
8. Pipetee 100 µl de conjugado anti-IL-6-HRP y 50 µl de diluyente de muestras en todos los pocillos.
9. Incube durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador horizontal configurado a 700 ± 100 rpm.
10. Aspire el líquido de cada pocillo.
11. Lave la placa 3 veces:
 - Dispensando 0,4 ml de solución de lavado en cada pocillo
 - Aspirando el contenido de cada pocillo
12. Pipetee 200 µl de la solución cromogénica en cada pocillo en los 15 minutos siguientes al paso de lavado.
13. Incube la placa de microvaloración durante 15 minutos a temperatura ambiente en un agitador horizontal configurado a 700 ± 100 rpm y evite la luz solar directa.
14. Pipetee 100 µl de solución de parada en cada pocillo.
15. Lea las absorbancias a 450 y 490 nm (filtro de referencia a 630 o 650 nm) antes de 3 horas y calcule los resultados conforme se describe en el apartado XI.

XI. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

A. Lectura policromática

1. En este caso, el software ELISA-AID™ 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 ELISA-AID™ 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-6 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-6 (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-6-EASIA		Unidades de DO Modelo policromático
Calibrador	0 pg/ml	79
	23,3 pg/ml	125
	68 pg/ml	193
	201 pg/ml	408
	633 pg/ml	1036
	2560 pg/ml	3579

XIII. EFICACIA Y LIMITACIONES

A. Límite de detección

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

B. Especificidad

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

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

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

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

No se observó ninguna interferencia.

C. Precisión

INTRAENSAYO				INTERENSAYO			
Suero	N	<X> ± DE (pg/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> ± DE (pg/ml)	CV (%)
A	20	147 ± 6,1	4,2	A	20	114 ± 5	4,4
B	20	623 ± 27	4,3	B	20	270 ± 15	5,4

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

D. Exactitud

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

PRUEBA DE DILUCIÓN

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

Las muestras se diluyeron con diluyente de muestras.

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

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

TIEMPO DE DEMORA

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

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

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

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

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

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

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Solo para uso diagnóstico *in vitro*.

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

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

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

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

XVII. BIBLIOGRAFÍA

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

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CALIBRADORES (µl)	MUESTRA(S) CONTROLES (µl)
Tampón de incubación	50	50
Calibradores (0-5)	100	-
Muestras, controles	-	100
Incuba durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación continua a 700 rpm. Aspire el contenido de cada pocillo. Lave 3 veces con 400 µl de solución de lavado y aspire.		
Conjugado anti-IL-6-HRP	100	100
Diluyente de muestras	50	50
Incuba durante 1 hora a temperatura ambiente 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	200	200
Incuba durante 15 min a temperatura ambiente 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).		

N.º de catálogo de DIAsource: KAP1261	Número de P.I.: 1700582/es	N.º de revisión: 161115/1
---	-------------------------------	------------------------------

Fecha de revisión: 2016-11-15



el

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

IL-6-EASIA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

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

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. **Εμπορική ονομασία:** Kit IL-6-EASIA της DIAsource
- B. **Αριθμός καταλόγου:** KAP1261: 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 ανθρώπινη ιντερλευκίνη 6 (IL-6) είναι ένα πολυπεπτίδιο 184 αμινοξέων με δυννητικές O και N θέσεις γλυκοζυλίωσης και σημαντική ομολογία με τον παράγοντα G-CSF. Παράγεται από διάφορα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των T- και B-κυττάρων, μονοκυττάρων, ινοβλαστών, κερατινοκυττάρων, ενδοθηλιακών κυττάρων, μεσαγγειακών κυττάρων, αστροκυττάρων, στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών και αρκετών νεοπλασματικών κυττάρων. Ρυθμίζει την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση διαφόρων κυτταρικών τύπων με κύριες δράσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα, την αιμοποίηση και τη φλεγμονή. Οι πολλαπλές αυτές δράσεις αποτελούν μέρος ενός πολύπλοκου δικτύου κυτταροκινών, όπου αρκετές κυτταροκίνες (IL-1, TNF, PDGF, IFN,...) επάγουν ή επάγονται από την IL-6 και οι τελικές επιδράσεις είναι αποτέλεσμα είτε συνεργικών είτε ανταγωνιστικών δράσεων μεταξύ της IL-6 και των υπόλοιπων κυτταροκινών (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IFN γ , IL-3, GM-CSF, M-CSF, CSF,...). Η IL-6 επάγει την τελική ωρίμανση των B-κυττάρων σε κύτταρα παραγωγής αντισωμάτων και αποτελεί ισχυρό αυξητικό παράγοντα για κύτταρα μυελώματος/πλασματοκυττώματος. Διεγείρει (και σε συνδυασμό) την ανάπτυξη των T-κυττάρων και τη διαφοροποίησή τους σε κυτταροτοξικά T-κύτταρα. Προάγει την ανάπτυξη των μεγακαρυοκυττάρων και δρα συνεργικά με άλλες κυτταροκίνες για τη διέγερση πολυδύναμων αιμοποιητικών προδρόμων. Μπορεί επίσης να επάγει αναστολή της διαφοροποίησης και της ανάπτυξης ορισμένων λευκαϊκών -ή μη αιμοποιητικών νεοπλασματικών κυτταρικών σειρών. Η IL-6 είναι επίσης κύριος επαγωγέας των αντιδράσεων οξείας φάσης ως απάντησης σε φλεγμονή ή τραυματισμό ιστών. Μαζί με τα IL-1 και TNF, επάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών οξείας φάσης (APP) από ηπατοκύτταρα, με μοτίβα προτίμησης των παραγόμενων APP, ανάλογα με την κυτταροκίνη ή το συνδυασμό τους. Η IL-6 αλληλεπιδρά επίσης με το νευροενδοκρινικό σύστημα, π.χ. επάγοντας την παραγωγή ACTH. Έτσι, Η IL-6 αποτελεί μία πλειοτροπική κυτταροκίνη με πολλαπλές ενδοκρινείς, παρακρινείς και πιθανώς αυτοκρινείς δράσεις σε διαφορετικούς τύπους ιστών.

B. Κλινικές εφαρμογές

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

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

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο προσδιορισμός IL-6-EASIA της DIAsource είναι ένας ενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός ενισχυμένης ευαισθησίας, στερεής φάσης, ο οποίος εκτελείται σε πλάκες μικροτιτλοδότησης. Ο προσδιορισμός χρησιμοποιεί μονοκλωνικά αντισώματα (MAbs) που κατευθύνονται εναντίον διακριτών επιτόπων της IL-6. Οι βαθμονομητές και τα δείγματα αντιδρούν με το μονοκλωνικό αντίσωμα σύλληψης (MAb 1) που είναι επιστρωμένο στην υποδοχή της πλάκας μικροτιτλοδότησης και με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα (MAb 2) σημασμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP). Μετά από μια περίοδο επώασης που επιτρέπει το σχηματισμό ενός σάντουιτς: επιστρωμένο MAb 1 – ανθρώπινη IL-6 – MAb 2 – HRP, η πλάκα μικροτιτλοδότησης υποβάλλεται σε πλύση για να απομακρυνθεί το σημασμένο με ένζυμο αδέσμευτο αντίσωμα. Το σημασμένο 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 μετρώντας την απορρόφηση, η οποία είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση της IL-6. Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζεται η συγκέντρωση της IL-6 στα δείγματα με αναγωγή από την καμπύλη βαθμονόμησης. Η χρήση του συστήματος ανάγνωσης EASIA (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	Kit 96 προσδιορισμών	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση
 Πλάκα μικροτιτλοδότησης με 96 υποδοχές επιστρωμένες με αντι IL-6 (μονοκλωνικά αντισώματα)	96 υποδοχές	μπλε	Έτοιμο για χρήση
Ab HRP Σύζευγμα: Αντι-IL-6 (μονοκλωνικά αντισώματα) σε ρυθμιστικό διάλυμα βορικών με βόεια ορολευκωματίνη και θυμόλη	1 φιαλίδιο 11 ml	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
CAL N Βαθμονομητής N = 0 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο πλάσμα με βόεια ορολευκωματίνη, βενζαμιδίνη και θυμόλη	6 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού
DIL SPE Διάλυμα αραιώσης δειγμάτων: ανθρώπινος πλάσμα με βόεια ορολευκωματίνη, βενζαμιδίνη και θυμόλη	3 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	μαύρο	Προσθέστε απεσταγμένου νερού (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων)
INC BUF Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης: Ρυθμιστικό διάλυμα βορικών με βόεια ορολευκωματίνη, βενζαμιδίνη και θυμόλη	1 φιαλίδιο 11 ml	μαύρο	Έτοιμο για χρήση
WASH SOLN CONC Διάλυμα πλύσης (Tris-HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 200 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
CONTROL N πλάσμα ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο πλάσμα με θυμόλη	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	πράσινο	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού
CHROM TMB Διάλυμα χρωμογόνου TMB	1 φιαλίδιο 25 ml	λευκό	Έτοιμο για χρήση
STOP SOLN Ανασχετικό διάλυμα: HCl 2N	1 φιαλίδιο 25 ml	λευκό	Έτοιμο για χρήση

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

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο kit:

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

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. **Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε τους βαθμονομητές με 1 ml απεσταγμένου νερού.
- B. **Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 1 ml απεσταγμένου νερού.
- Γ. **Διάλυμα αραιώσης δειγμάτων:** Ανασυστήστε το διάλυμα αραιώσης δειγμάτων στον όγκο που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου με απεσταγμένο νερό.
- Δ. **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 kit 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 συμπυκνωμένο 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 kit ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Ο ορός θα πρέπει να απομακρυνθεί όσο το δυνατόν νωρίτερα από το πύγμα των ερυθροκυττάρων μετά την πήξη και τη φυγοκέντριση και να διατηρηθεί στους 4°C. Αν τα δείγματα δεν χρησιμοποιηθούν αμέσως, θα πρέπει να διατηρηθούν στους -20°C επί 2 μήνες το μέγιστο και στους -70°C για μεγαλύτερης διάρκειας φύλαξη (έως ένα έτος).
- Αποφύγετε 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-6 από αιμοκύτταρα και θα αύξαναν εσφαλμένα τις τιμές της IL-6 στον ορό.
- Τα σωληνάρια συλλογής θα πρέπει να είναι ελεύθερα πυρογενών.

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.
Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση.
Εκτελέστε εις διπλούν ανάληψη των βαθμονομητών, των ορών ελέγχου και των δειγμάτων. Συνιστάται κάθετη ευθυγράμμιση.
Χρησιμοποιήστε ένα καθαρό, πλαστικό δοχείο για να ετοιμάσετε το διάλυμα πλύσης.
Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση.
Για τη διανομή του χρωμογόνου διαλύματος και του ανασχετικού διαλύματος αποφύγετε πιπέτες με μεταλλικά μέρη.
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.
Διανείμετε το χρωμογόνο διάλυμα εντός 15 λεπτών από την πλύση της πλάκας μικροτιτλοδότησης.
Κατά τη διάρκεια της επώασης με το χρωμογόνο διάλυμα, αποφύγετε την άμεση έκθεση της πλάκας μικροτιτλοδότησης στο ηλιακό φως.

- 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 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος επώασης σε όλες τις υποδοχές.
 - Διανείμετε με πιπέτα 100 μl από κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα στις κατάλληλες υποδοχές.
 - Επώαστε επί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε οριζόντιο αναδευτήρα στις 700 rpm $\pm$ 100 rpm.
 - Αναρροφήστε το υγρό από κάθε υποδοχή.
 - Πλύνετε την πλάκα 3 φορές:
 - διανέμοντας 0,4 ml διαλύματος πλύσης σε κάθε υποδοχή.
 - αναρροφώντας το περιεχόμενο κάθε υποδοχής
 - Διανείμετε με πιπέτα 100 μl συζεύγματος Αντι-IL-6-HRP και 50 μl διαλύματος αραίωσης δειγμάτων σε όλες τις υποδοχές.
 - Επώαστε επί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε οριζόντιο αναδευτήρα στις 700 rpm $\pm$ 100 rpm.
 - Αναρροφήστε το υγρό από κάθε υποδοχή.
 - Πλύνετε την πλάκα 3 φορές:
 - διανέμοντας 0,4 ml διαλύματος πλύσης σε κάθε υποδοχή
 - αναρροφώντας το περιεχόμενο κάθε υποδοχής
 - Διανείμετε με πιπέτα 200 μl χρωμογόνου διαλύματος σε κάθε υποδοχή εντός 15 λεπτών από το βήμα πλύσης.
 - Επώαστε την πλάκα μικροτιτλοδότησης επί 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε οριζόντιο αναδευτήρα στις 700 rpm $\pm$ 100 rpm, αποφύγετε την άμεση έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία.
 - Διανείμετε με πιπέτα 100 μl ανασχετικού αντιδραστηρίου σε κάθε υποδοχή
 - Κάντε ανάγνωση των απορροφήσεων στα 450 nm και 490 nm (φίλτρο αναφοράς 630 nm ή 650 nm) εντός 1 ώρας και υπολογίστε τα αποτελέσματα όπως περιγράφεται στην ενότητα XI.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- A. Πολυχρωματική ανάγνωση:**
- Στην περίπτωση αυτή, την επεξεργασία των δεδομένων θα κάνει το λογισμικό του ELISA-AID™.
 - 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 ELISA-AID™ θα ενεργοποιήσει αυτόματα τη συσκευή ανάγνωσης και θα ενσωματώσει και τις δύο μετρήσεις σε ένα πολυχρωματικό μοντέλο. Αυτή η τεχνική μπορεί να δημιουργήσει οπτικές πυκνότητες (OD) έως και 10.
 - 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-6 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 ημίλογαριθμικό ή γραμμικό χαρτί γραφημάτων, παραστήστε γραφικά τις τιμές OD (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της IL-6 (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-6-EASIA		Μονάδες OD Πολυχρωματικό μοντέλο
Βαθμονομητής	0 pg/ml	79
	23,3 pg/ml	125
	68 pg/ml	193
	201 pg/ml	408
	633 pg/ml	1036
	2560 pg/ml	3579

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

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

B. Ειδικότητα

Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διασταυρούμενη αντίδραση παρουσία 50 ng of IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN-α, IFN-γ, LIF, MIP-1α, MIP-1β, MCP-1, OSM, RANTES, TGF-β, TNF-α and TNF-β. Ελάχιστη διασταυρούμενη αντίδραση (0.06%) παρατηρείται με τον παράγοντα G-CSF.

Επίδραση των διαλυτών υποδοχέων (sIL6R και sgp-130)

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

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

Δεν ανιχνεύθηκαν επιδράσεις

Γ. Ακρίβεια

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

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

Δ. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ			
Δείγμα	Προστεθείσα IL-6 (pg/ml)	Ανακτηθείσα IL-6 (pg/ml)	Ανάκτηση (%)
Ορός 1	1066	1035	97.1
	547	541	98.9
	228	234	102.6
Ορός 2	1066	1110	104.1
	547	531	97.1
	228	250	109.6

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

Τα δείγματα αραιώθηκαν με το διάλυμα αραιώσης δειγμάτων.

Ε. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος
Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν αξιόπιστα ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 30 λεπτά μετά την προσθήκη των βαθμονομητών στα επιστρωμένα σωληνάρια.

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

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης. Οροί ελέγχου που περιέχουν 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.

Τα παρακάτω αποτελέσματα παρέχονται μόνο ως οδηγός: τα αποτελέσματα 34 δειγμάτων ορού εμφανώς υγιών ατόμων με χαμηλά επίπεδα CRP, κυμάνθηκαν μεταξύ 0 και 50 pg/ml. 31 δείγματα έλαβαν τιμές κάτω από 17 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 την άμεση επαφή του δέρματος με όλα τα αντιδραστήρια· το ανασχετικό διάλυμα περιέχει HCl. Σε περίπτωση επαφής, πλύνετε σχολαστικά με νερό.
Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης.

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

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

Αρ. καταλόγου DIASource: KAP1261	Αριθμός P.I.: 1700582/el	Αρ. αναθεώρησης: 161115/1
-------------------------------------	-----------------------------	------------------------------

Ημερομηνία αναθεώρησης: 2016-11-15