

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Interleukin-6 human ELISA

Enzyme immunoassay for the quantitative measurement of human Interleukin-6 (IL-6) in serum



DE4640



96 wells

1. INTENDED USE

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

2. 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.

3. PRINCIPLES OF THE METHOD

The Demeditec IL-6-ELISA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on microtiterplate. The assay uses monoclonal antibodies (MAbs) directed against distinct epitopes of IL-6. Calibrators and samples react with the capture monoclonal antibody (MAB 1) coated on microtiter well and with a monoclonal antibody (MAB 2) labelled with horseradish peroxidase (HRP). After an incubation period allowing the formation of a sandwich:

coated MAB 1 – human IL-6 – MAB 2 – HRP,

the microtiterplate is washed to remove unbound enzyme labelled antibody. Bound enzyme-labelled antibody is measured through a chromogenic reaction. Chromogenic solution (TMB) is added and incubated. The reaction is stopped with the addition of Stop Solution and the microtiterplate is then read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is proportional to the IL-6 concentration.

A calibration curve is plotted and IL-6 concentration in samples is determined by interpolation from the calibration curve. The use of the ELISA reader (linearity up to 3 OD units) and a sophisticated data reduction method (polychromatic data reduction) result in a high sensitivity in the low range and in an extended calibration range.

4. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 tests Kit	Reconstitution
SORB MT Microtiterplate with 96 anti IL-6 (monoclonal antibodies) coated wells	96 wells	Ready for use
ENZ CONJ Conjugate: HRP labelled anti-IL-6 (monoclonal antibodies) in Borate buffer with bovine serum albumin and thymol	1 vial 11 ml	Ready for use
CAL 0 – 5 Calibrator N = 0 to 5 (see exact values on QC data sheet) in human plasma with bovine serum albumin, benzamidin and thymol	6 vials lyophil.	Add 1 ml distilled water
SAM DIL Specimen Diluent: human plasma with bovine serum albumin, benzamidin and thymol	2 vials lyophil.	Add distilled water (see on the QC data sheet for the exact volume)
INC BUF Incubation buffer: Borate buffer with bovine serum albumin, benzamidin and thymol	1 vial 11 ml	Ready for use
WASH SOLN 200x Wash Solution (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CONTROL 1 & 2 Controls - N = 1 or 2 in human plasma with thymol	2 vials lyophil.	Add 1 ml distilled water
SUB TMB Chromogenic TMB Solution	1 vial 25 ml	Ready for use
STOP SOLN Stop Solution: HCl 2N	1 vial 12 ml	Ready for use

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

5. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

1. High quality distilled water
2. Pipettes for delivery of: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml and 10 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Horizontal microtiterplate shaker capable of 700 rpm ± 100 rpm
6. Washer for Microtiterplates
7. Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm, 490 nm and 650 nm (in case of polychromatic reading) or capable of reading at 450 nm and 650 nm (bichromatic reading)
8. Optional equipment: The ELISA-AID™ necessary to read the plate according to polychromatic reading (see paragraph 10.A.) can be purchased from Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

6. REAGENT PREPARATION

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

7. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

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

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

9. PROCEDURE

A. Handling notes

- Do not use the kit or components beyond expiry date.
- Do not mix materials from different kit lots.
- Bring all the reagents to room temperature (18-25°C) prior to use.
- Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
- Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
- Use a clean plastic container to prepare the Wash Solution.
- In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
- For the dispensing of the Chromogenic Solution and the Stop Solution avoid pipettes with metal parts.
- High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
- Respect the incubation times.
- To avoid drift, the time between pipetting of the first calibrator and the last sample must be limited to the time mentioned in section 12 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

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

10. CALCULATION OF RESULTS

A. Polychromatic Reading:

1. In this case, the ELISA-AID™ software will do the data processing.
2. The plate is first read at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
3. A second reading is performed at 490 nm against the same reference filter.
4. The ELISA-AID™ Software will drive the reader automatically and will integrate both readings into a polychromatic model. This technique can generate OD's up to 10.
5. The principle of polychromatic data processing is as follows:
 - X_i = 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

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

11. TYPICAL DATA

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

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

12. PERFORMANCE AND LIMITATIONS**A. Detection Limit**

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

B. Specificity

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

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

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

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

No interference was observed.

C. Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> \pm SD (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> \pm SD (pg/ml)	CV (%)
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

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 Conc. (pg/ml)	Measured Conc. (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

13. INTERNAL QUALITY CONTROL

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

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. SUMMARY OF THE PROTOCOL

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

1. VERWENDUNGSZWECK

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

2. 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, IFNy, IL-3, GM-CSF, M-CSF, CSF ...). IL-6 induziert die endgültige Reifung von B-Zellen zu Antikörper-produzierenden 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.

3. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

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

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

4. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Tests Kit	Rekonstitution
SORB MT Mikrotiterplatte mit 96 anti-IL-6- beschichteten Wells (monoklonale Antikörper)	96 Wells	gebrauchsfertig
ENZ CONJ Konjugat: MRP markierte anti-IL-6 (monoklonaler Antikörper) in Boratpuffer mit Rinderserumalbumin und Thymol	1 Gefäß 11 ml	gebrauchsfertig
CAL 0 – 5 Kalibrator N = 0 bis 5 (genaue Werte auf QC Datenblatt) in Humanplasma mit Rinderserumalbumin und Thymol	6 Gefäße lyophil.	1 ml destilliertes Wasser zugeben
SAM DIL Probenverdünner: Humanplasma mit Rinderserumalbumin, Benzamidin und Thymol	2 Gefäße lyophil.	Dest. Wasser zugeben (das exakte Volumen bitte dem QC datenblatt entnehmen)
INC BUF Inkubationspuffer: Boratpuffer mit Rinderserumalbumin, Benzamidin und Thymol	1 Gefäß 11 ml	gebrauchsfertig
WASH SOLN 200x Waschlösung (Tris-HCl)	1 Gefäß 10 ml	200 x mit destilliertem Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
CONTROL 1 & 2 Kontrollen - N = 1 oder 2 in Humanplasma mit Thymol	2 Gefäße lyophil.	1 ml destilliertes Wasser zugeben
SUB TMB Chromogene TMB-Lösung	1 Gefäß 25 ml	gebrauchsfertig
STOP SOLN Stopplösung: HCL 2N	1 Gefäß 12 ml	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.

5. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

1. Hochwertiges destilliertes Wasser
2. Pipetten: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml und 10 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegplastikspitzen wird empfohlen)
3. Vortex-Mixer
4. Magnetrührer
5. Horizontaler Schüttler für Mikrotiterplatte Kap. 700 rpm ± 100 rpm
6. Waschgerät für Mikrotiterplatten
7. 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)
8. Optional: ELISA-AID™ zur Auswertung der Platte nach polychromatischer Methode (siehe Abschnitt 10.A.), erhältlich bei Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

6. 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 QC Datenblatt 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.

7. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

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

8. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

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

9. DURCHFÜHRUNG

A. Bemerkungen zur Durchführung

- Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach dem Ablaufdatum.
- Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht.
- Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur (18-25°C).
- Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.
- Führen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben doppelt aus. Vertikale Ausrichtung wird empfohlen.
- Verwenden Sie zur Zubereitung der Waschlösung einen reinen Kunststoffbehälter.
- Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Verwenden Sie zur Pipettierung der chromogenen Lösung und der Stopplösung keine Pipetten mit Metallteilen.
- Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.
- Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.
- Zur Vermeidung von Drift muss die Zeit zwischen dem Pipettieren des ersten Kalibrators und der letzten Probe auf die Zeit beschränkt werden, die in Abschnitt 12 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

1. Wählen Sie die erforderliche Anzahl der Streifen für den Lauf aus. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen sollten wieder dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2 bis 8 °C gelagert werden.
2. Befestigen Sie die Streifen im Halterahmen.
3. Pipettieren Sie jeweils 50 µl Inkubationspuffer in alle Wells
4. Pipettieren Sie jeweils 100 µl Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden **Wells**.
5. Inkubieren Sie 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) auf dem horizontalen Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm.
6. Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
7. Waschen Sie die Platte dreimal:
 - pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jedes Well
 - saugen Sie den Inhalt jedes Wells ab.
8. Pipettieren Sie 100 µl anti-IL-6-HRP-Konjugat und 50 µl Probenverdünner in jeden Well.
9. Inkubieren Sie 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) auf dem horizontalen Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm.
10. Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
11. Waschen Sie die Platte dreimal:
 - pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jedes Well
 - saugen Sie den Inhalt jedes Wells ab.
12. Pipettieren Sie 200 µl der chromogenen Lösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jeden Well
13. Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) auf dem horizontalen Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm. Vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
14. Pipettieren Sie 100 µl der Stopplösung in jedes Well.
15. 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 10 beschrieben.

10. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE**A. Polychromatische Auswertung**

1. In diesem Fall werden die Daten durch die ELISA-AID™ Software verarbeitet.
2. Die Platte wird zunächst bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) ausgewertet.
3. Eine zweite Auswertung erfolgt bei 490 nm gegen denselben Referenzfilter.
4. Die ELISA-AID™ Software steuert das Lesegerät automatisch und integriert beide Auswertungen in ein polychromatisches Modell. Diese Technik kann ODs bis 10 erstellen.
5. Das Prinzip der polychromatischen Datenauswertung funktioniert wie folgt:
 - $X_i = \text{OD bei 450 nm}$
 - $Y_i = \text{OD bei 490 nm}$
 - 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

1. Werten Sie die Platte bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) aus.
2. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
3. Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier 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.
4. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Kalibrationskurve.
5. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer "4 Parameter"-Kurvenfunktion.

11. TYPISCHE WERTE

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

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

12. 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-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , LIF, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, OSM, RANTES, TGF- β , TNF- α 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> \pm SD (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> \pm SD (pg/ml)	CV (%)
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

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

13. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

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

14. 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.

15. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN**Sicherheit**

Nur für diagnostische Zwecke.

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

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

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

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

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

16. LITERATUR

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

17. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

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

1. USO DEL KIT

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

2. 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.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Demeditec IL-6-ELISA è un immunosaggio a sensibilità amplificata a fase solida eseguito su piastre di microtitolazione. Il dosaggio utilizza anticorpi monoclonali (Mabs) diretti contro epitopi distinti dell'IL-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 cromogena. Si procede quindi con l'aggiunta della soluzione cromogena (TMB) e successiva incubazione. La reazione viene interrotta con l'aggiunta di Soluzione di arresto; quindi la piastra di microtitolazione viene letta alla lunghezza d'onda adeguata. La quantità di turnover del substrato viene determinata colorimetricamente misurando l'assorbanza che è proporzionale alla concentrazione di IL-6.

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

4. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Volume di ricostituzione
SORB MT Piastra di microtitolazione con 96 pozzetti, rivestiti anti IL-6 (anticorpi monoclonali)	96 pozzetti	Pronte per l'uso
ENZ CONJ Coniugato: anti-IL-6 (anticorpi monoclonali) marcato con HRP in tampone borato con albumina di siero bovino e timolo	1 fialone 11 ml	Pronte per l'uso
CAL 0 - 5 Calibratore N= 0-5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle QC data sheet), in plasma umano con albumina di siero bovino, benzamidina e timolo	6 fialoni liofiliz.	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
SAM DIL Diluyente del Campione: plasma umano con albumina di siero bovino, benzamidina e timolo.	2 fialoni liofiliz.	Aggiungere acqua distillata (vedi QC data sheet per volumi esatti)
INC BUF Tampone di Incubazione: Tampone borato con albumina di siero bovino, benzamidina e timolo.	1 fialone 11 ml	Pronte per l'uso
WASH SOLN 200x Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	1 fialone 10 ml	Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico)
CONTROL 1 & 2 Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano con timolo	2 fialoni liofiliz.	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
SUB TMB Soluzione Cromogena TMB	1 fialone 25 ml	Pronto per l'uso
STOP SOLN Soluzione di arresto: HCl 2N	1 fialone 12 ml	Pronto per l'uso

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

5. 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 10.A) è acquistabile presso Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

6. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. Calibratore:** Ricostituire i calibratori con 1 ml di acqua distillata.
- B. Controlli:** Ricostituire i controlli con 1 ml di acqua distillata.
- C. Diluyente del Campione:** Ricostituire il Diluyente del Campione aggiungendo acqua distillata fino al volume riportato sulle QC data sheet.
- 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.

7. 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 (18-25°C) fino alla data di scadenza.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il coniugato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

8. 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 (18-25°C). Si raccomanda di vortexare i campioni prima di utilizzarli.
- Le condizioni di raccolta possono influenzare i valori. Adottare pertanto le massime precauzioni durante la raccolta per evitare che eventuali impurità contenute nei campioni possano stimolare la produzione di IL-6 da parte delle cellule ematiche con conseguente aumento falsato dei livelli sierici di IL-6.
- Le provette di raccolta devono essere apirogene.

9. METODO DEL DOSAGGIO

A. Avvertenze generali

- Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza.
- Non mescolare reattivi di lotti diversi.
- Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente (18-25°C).
- Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione.
- Eseguire calibratori, controlli e campioni in doppio. Si raccomanda l'allineamento verticale.
- Utilizzare un contenitore di plastica pulito per preparare la soluzione di lavaggio.
- Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.
- Per la distribuzione della soluzione cromogena e la Soluzione di arresto evitare pipette con parti metalliche.
- L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio.
- Rispettare i tempi di incubazione.
- Per evitare derive, l'intervallo tra il pipettaggio del primo calibratore e l'ultimo campione deve essere limitato ai tempi riportati nella sezione 12, 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 (18-25°C) su un agitatore orizzontale a 700 ± 100 rpm.
6. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
7. Lavare la piastra 3 volte :
 - versando 0,4 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
 - aspirando il contenuto di ogni pozzetto
8. Pipettare 100 µl di coniugato anti-IL-6-HRP e 50 µl di diluente del campione in tutti i pozzetti.
9. Incubare per 1 ora a temperatura ambiente (18-25°C) su un agitatore orizzontale a 700 ± 100 rpm.
10. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
11. Lavare la piastra 3 volte :
 - versando 0,4 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
 - aspirando il contenuto di ogni pozzetto
12. Pipettare in ogni pozzetto 200 µl di Soluzione Cromogena entro 15 minuti dal termine della fase di lavaggio.
13. Incubare la piastra di microtitolazione per 15 minuti a temperatura ambiente (18-25°C) su un agitatore orizzontale a 700 ± 100 rpm; evitare la luce diretta del sole.
14. Pipettare 100 µl di soluzione di arresto in ogni pozzetto.
15. Leggere le 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 10.

10. CALCOLO DEI RISULTATI**A. Lettura policromatica:**

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

B. Lettura bicromatica

1. Leggere la piastra a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcolare la media delle determinazioni in 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.

11. CARATTERISTICHE TIPICHE

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

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

12. 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-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , LIF, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, OSM, RANTES, TGF- β , TNF- α and TNF- β . 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> \pm SD (pg/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> \pm SD (pg/ml)	CV (%)
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

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

13. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sulle QC data sheet, 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.

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. SCHEMA DEL DOSAGGIO

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

1. INDICACIONES

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

2. 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.

3. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El Demeditec IL-6-ELISA es un inmunoensayo enzimático de sensibilidad amplificada en fase sólida que se realiza en placa de microvaloración. El ensayo utiliza anticuerpos monoclonales (AcM) dirigidos contra distintos 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 colorimétricamente midiendo la absorbancia, que es proporcional a la concentración de IL-6.

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

4. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Reactivos	Kit de 96 pruebas	Reconstitución
SORB MT Placa de microvaloración de 96 pocillos recubiertos con anti-IL-6	96 pocillos	Lista para usar
ENZ CONJ Conjugado: anti-IL-6 (anticuerpos monoclonales) marcada con HRP en tampón de borato con albúmina de suero bovino y timol	1 vial 11 ml	Listo para usar
CAL 0 - 5 Calibrador N = 0 a 5 (véanse los valores exactos en la QC data sheet) en plasma humano con albúmina de suero bovino, benzamidina y timol	6 viales liofil.	Añadir 1 ml de agua destilada
SAM DIL Diluyente de muestras: plasma humano con albúmina de suero bovino, benzamidina y timol	2 viales liofil.	Añadir agua destilada (véase en QC data sheet el volumen exacto)
INC BUF Tampón de incubación: tampón de borato con albúmina de suero bovino, benzamidina y timol	1 vial 11 ml	Listo para usar
WASH SOLN 200x Solución de lavado (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	Diluir 200 x con agua destilada (usar un agitador magnético)
CONTROL 1 & 2 Controles - N = 1 o 2 en plasma humano con timol	2 viales liofil.	Añadir 1 ml de agua destilada
SUB TMB Solución de TMB cromogénica	1 vial 25 ml	Lista para usar
STOP SOLN Solución de parada: HCl 2N	1 vial 12 ml	Lista para usar

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.

5. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

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

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

6. 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 QC data sheet 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.

7. CONSERVACIÓN Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

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

8. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

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

9. PROCEDIMIENTO

A. Notas sobre la manipulación

- No utilice el kit o sus componentes pasada la fecha de caducidad.
- No mezcle materiales de distintos lotes de kit.
- Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (18-25°C) antes de usar.
- Mezcle bien todos los reactivos y muestras agitándolos o revolviéndolos suavemente.
- Realice los calibradores, los controles y las muestras por duplicado. Se recomienda alinear verticalmente.
- Utilice un recipiente de plástico limpio para preparar la solución de lavado.
- Para prevenir que se produzca contaminación cruzada, utilice una punta de pipeta desechable al añadir cada reactivo y muestra.
- No utilice pipetas con partes metálicas para dispensar la solución cromogénica y la solución de parada.
- Las pipetas de alta precisión o un equipo de pipeteo automatizado mejorarán la precisión.
- Respete los tiempos de incubación.
- Para que no haya desvíos, el tiempo entre el pipeteo del primer calibrador y la última muestra debe limitarse al tiempo indicado en el apartado 12, 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 (18-25°C) 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 (18-25°C) 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 (18-25°C) 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 10.

10. 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.

11. DATOS TÍPICOS

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

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

12. 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-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , LIF, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, OSM, RANTES, TGF- β , TNF- α 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> \pm DE (pg/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> \pm DE (pg/ml)	CV (%)
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

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

13. 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 QC data sheet, 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.

14. 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.

15. 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.



16. BIBLIOGRAFÍA

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

17. RESUMEN DEL PROTOCOLO

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

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Ussage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore