



Instructions for Use

IL-6 ELISA

IVD



REF EIA-4640



96



DRG 

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG 

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti

1	INTENDED USE.....	3
2	CLINICAL BACKGROUND	3
3	PRINCIPLES OF THE METHOD	3
4	REAGENTS PROVIDED.....	4
5	SUPPLIES NOT PROVIDED	4
6	REAGENT PREPARATION	4
7	STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS	5
8	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	5
9	PROCEDURE	5
10	CALCULATION OF RESULTS.....	6
11	TYPICAL DATA.....	7
12	PERFORMANCE AND LIMITATIONS	7
13	INTERNAL QUALITY CONTROL.....	8
14	REFERENCE INTERVALS	8
15	PRECAUTIONS AND WARNINGS	8
1	VERWENDUNGSZWECK.....	9
2	KLINISCHER HINTERGRUND	9
3	GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG	9
4	MITGELIEFERTE REAGENZIEN.....	10
5	ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL	10
6	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN.....	10
7	AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN.....	11
8	PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG	11
9	DURCHFÜHRUNG	11
10	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	12
11	TYPISCHE WERTE	13
12	LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK	13
13	INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE	14
14	REFERENZINTERVALLE	14
15	VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN	14

1	USO DEL KIT	15
2	INFORMAZIONI CLINICHE	15
3	PRINCIPIO DEL METODO	15
4	REATTIVI FORNITI.....	16
5	REATTIVI NON FORNITI.....	16
6	PREPARAZIONE DEI REATTIVI	16
7	CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI	17
8	RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.....	17
9	METODO DEL DOSAGGIO	17
10	CALCOLO DEI RISULTATI.....	18
11	CARATTERISTICHE TIPICHE.....	19
12	CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO.....	19
13	CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO	20
14	INTERVALLI DI RIFERIMENTO.....	20
15	PRECAUZIONI PER L'USO.....	20
16	BIBLIOGRAPHY / RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	21
17	SUMMARY OF THE PROTOCOL.....	21
	SYMBOLS USED.....	22

1 INTENDED USE

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

2 CLINICAL BACKGROUND

2.1 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.

2.2 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 DRG 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 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.

4 REAGENTS PROVIDED

Reagents		96 tests Kit	Reconstitution
Microtiterplate with 96 anti-IL-6 (monoclonal antibodies) coated wells	MICROTITER PLATE	96 wells	Ready for use
Conjugate: HRP labelled anti-IL-6 (monoclonal antibodies) in Borate buffer with bovine serum albumin and thymol	Ab HRP	1 vial 11 mL	Ready for use
Calibrator N = 0 to 5 (see exact values on vial labels) in human plasma with bovine serum albumin, benzamidin and thymol	CAL N	6 vials lyophil.	Add 1 mL distilled water
Specimen Diluent: human plasma with bovine serum albumin, benzamidin and thymol	DIL SPE	3 vials lyophil.	Add distilled water (see on the label for the exact volume)
Incubation buffer: Borate buffer with bovine serum albumin, benzamidin and thymol	INC BUF	1 vial 11 mL	Ready for use
Wash Solution conc. (Tris-HCl)	WASH SOLN CONC	1 vial 10 mL	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
Control - N = 1 or 2 in human plasma with thymol	CONTROL N	2 vials lyophil.	Add 1 mL distilled water
Chromogenic TMB Solution	CHROM TMB	1 vial 25 mL	Ready for use
Stop Solution: HCl, 2 N	STOP SOLN	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:

- High quality distilled water
- Pipettes for delivery of: 50 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 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 \pm 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 10.1.) 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 vial label with distilled water

D. Working Wash solution:

Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 199 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (200x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

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 °C - 8 °C.
- Unused strips must be stored, at 2 °C - 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 °C - 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 °C - 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 °C - 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 °C - 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

9.1 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 °C - 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 *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 microtiter plate.

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

9.2 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 °C - 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 °C - 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 °C - 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 microtiter plate for 15 minutes at room temperature (18 °C - 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

10.1 Polychromatic Reading

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

$X_i = \text{OD at 450 nm}$

$Y_i = \text{OD at 490 nm}$

Using a calibrator unweighted linear regression, the parameters A & B are calculated : $Y = A \times X + B$

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.

10.2 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
Standard	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

12.1 Detection Limit

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

12.2 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.

12.3 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

12.4 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.

12.5 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 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.

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.

1 VERWENDUNGSZWECK

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

2 KLINISCHER HINTERGRUND

2.1 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 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.

2.2 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 DRG IL-6 ELISA ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay (EASIA) 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 ELISAA-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
Mikrotiterplatte mit 96 anti-IL-6-beschichteten Wells (monoklonale Antikörper)	MICROTITER PLATE	96 Wells	gebrauchsfertig
Konjugat: MRP-markierte anti-IL-6-Antikörper (monoklonal) in Boratpuffer mit Rinderserumalbumin und Thymol	Ab HRP	1 Gefäß 11 mL	gebrauchsfertig
Kalibrator N = 0 bis 5 (genaue Werte auf Gefäßetiketten) in Humanplasma mit Rinderserumalbumin und Thymol	CAL N	6 Gefäße lyophil.	1 mL destilliertes Wasser zugeben
Probenverdünner: Humanplasma mit Rinderserumalbumin, Benzamidin und Thymol	DIL SPE	3 Gefäße lyophil.	Dest. Wasser zugeben (das exakte Volumen bitte dem Etikett entnehmen)
Inkubationspuffer: Boratpuffer mit Rinderserumalbumin, Benzamidin und Thymol	INC BUF	1 Gefäß 11 mL	gebrauchsfertig
Waschlösung (Tris-HCl)	WASH SOLN CONC	1 Gefäß 10 mL	200 x mit destilliertem Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
Kontrollen - N = 1 oder 2 in Humanplasma mit Thymol	CONTROL N	2 Gefäße lyophil.	1 mL destilliertes Wasser zugeben
Chromogene TMB-Lösung	CHROM TMB	1 Gefäß 25 mL	gebrauchsfertig
Stopplösung: HCL 2N	STOP SOLN	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 10.1.), 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 auf dem Etikett des Fläschchens angegebenen Volumen mit destilliertem 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 °C 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 °C 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 °C - 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

9.1 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 °C - 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 sauberen Kunststoffbehälter.

Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.

Verwenden Sie zum Pipettieren 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 12.5 (Zeitverzögerung) erwähnt wird.

Erstellen Sie für jeden Testansatz eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Testansätzen.

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.

9.2 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 °C 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 °C - 25 °C) auf dem horizontalen Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm.
6. Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
Waschen Sie die Platte dreimal:
pipettieren Sie 0,4 mL Waschlösung in jedes Well
saugen Sie den Inhalt jedes Wells ab.
7. Pipettieren Sie 100 µL anti-IL-6-HRP-Konjugat und 50 µL Probenverdünner in jedes Well.
8. Inkubieren Sie 1 Stunde bei Raumtemperatur (18 °C - 25 °C) auf dem Horizontal-Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm.
9. Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab
Waschen Sie die Platte dreimal:
pipettieren Sie 0,4 mL Waschlösung in jedes Well
saugen Sie den Inhalt jedes Wells ab.
10. Pipettieren Sie 200 µL der chromogenen Lösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jedes Well
11. Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 15 Minuten bei Raumtemperatur (18 °C - 25 °C) auf dem Horizontal-Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm. Vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
12. Pipettieren Sie 100 µL der Stopplösung in jedes Well.
13. 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

10.1 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: $Y = A \times X + B$
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.

10.2 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
Standard	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

12.1 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.

12.2 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.

IL6 Konz. (pg/mL)	IL6 gemessen mit 100 ng/mL sIL6R (pg/mL)	IL6 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.

12.3 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

12.4 Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST

Probe	Zugegebenes IL-6 (pg/mL)	Wiedergefundenes IL-6 (pg/mL)	Wiederfindung (%)
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.

12.5 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 den Fläschchen angegebenen Sollwertbereichen, können die Ergebnisse nicht ohne treffende Erklärung der Abweichungen verwendet werden.

Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seine eigenen Pools herstellen, die in Aliquoten eingefroren werden sollten. Azidhaltige Kontrollen stören die Enzymreaktion und können nicht verwendet werden.

Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten einer Doppelbestimmung von Proben sollten auf Guter Laborpraxis beruhen.

Es wird empfohlen, Kontrollen im Assay routinemäßig wie unbekannte Proben zu behandeln, um die Assayvarianz zu messen. Die Leistung des Assays sollte mit Qualitätskontrollkarten der Kontrollen überprüft werden.

Es hat sich bewährt, die durch den Computer ausgewählte Kurvenanpassung visuell zu überprüfen.

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.

1 USO DEL KIT

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

2 INFORMAZIONI CLINICHE

2.1 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.

2.2 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

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 cromogenica. Si procede quindi con l'aggiunta della soluzione cromogena (TMB) e successiva incubazione. La reazione viene interrotta con l'aggiunta di Soluzione di arresto; quindi la piastra di microtitolazione viene letta alla lunghezza d'onda adeguata. La quantità di turnover del substrato viene determinata colorimetricamente misurando l'assorbanza che è proporzionale alla concentrazione di IL-6.

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

4 REATTIVI FORNITI

Reattivi		Kit da 96 test	Volume di ricostituzione
Piastra di microtitolazione con 96 pozzetti , rivestiti anti IL-6 (anticorpi monoclonali)	MICROTITER PLATE	96 pozzetti	Pronte per l'uso
Coniugato: anti-IL-6 (anticorpi monoclonali) marcato con HRP in tampone borato con albumina di siero bovino e timolo	Ab HRP	1 flacone 11 mL	Pronte per l'uso
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	CAL N	6 flaconi liofiliz.	Aggiungere 1 mL di acqua distillata
Diluyente del Campione: plasma umano con albumina di siero bovino, benzamidina e timolo.	DIL SPE	3 flaconi liofiliz.	Aggiungere acqua distillata (vedi etichetta per volumi esatti)
Tampone di Incubazione: Tampone borato con albumina di siero bovino, benzamidina e timolo.	INC BUF	1 flacone 11 mL	Pronte per l'uso
Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	WASH SOLN CONC	1 flacone 10 mL	Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico).
Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano con timolo	CONTROL N	2 flaconi liofiliz.	Aggiungere 1 mL di acqua distillata
Soluzione Cromogena TMB	CHROM TMB	1 flacone 25 mL	Pronto per l'uso
Soluzione di arresto: HCl 2N	STOP SOLN	1 flacone 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 10.1) è acquistabile presso Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

6 PREPARAZIONE DEI REATTIVI**Calibratore:**

Ricostituire i calibratori con 1 mL di acqua distillata.

Controlli:

Ricostituire i controlli con 1 mL di acqua distillata.

Diluyente del Campione:

Ricostituire il Diluyente del Campione aggiungendo acqua distillata fino al volume riportato sull'etichetta del flacone.

Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:

Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 199 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (200x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

7 CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2 °C - 8 °C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Le strisce reattive inutilizzate devono essere conservate a 2 °C - 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 °C - 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 °C - 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 °C - 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 °C - 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**9.1 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 °C - 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 12.5 (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.

9.2 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 °C - 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 °C - 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 °C - 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 °C - 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

10.1 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:
 $X_i = \text{OD a } 450 \text{ nm}$
 $Y_i = \text{OD a } 490 \text{ nm}$
Utilizzando una regressione lineare standard non pesata, i parametri A & B sono calcolati: $Y = A \times X + B$
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.

10.2 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

12.1 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.

12.2 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.

12.3 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

12.4 Accuratezza

TEST DI RECUPERO

Campione	IL-6 aggiunta (pg/mL)	L-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.

12.5 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 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.

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 BIBLIOGRAPHY / 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 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 °C - 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 °C - 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 °C - 25 °C) with continuous shaking at 700 rpm.		
Stop Solution	100	100
Read on a microtiter plate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (and 490 nm) versus 630 (or 650 nm)		

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Chargencode *	Codice del lotto	Codigo de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité