

Product information



User's Manual



Distribuito in ITALIA da
Li StarFish S.r.l.
Via Cavour, 35
20063 Cernusco S/N (MI)
telefono 02-92150794
fax 02-92157285
info@listarfish.it
www.listarfish.it

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. 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 TNF, 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 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
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 μ l di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Coniugato anti-IL-6-HRP Diluente del Campione	100 50	100 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 μ l 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)		

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	Usage 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



Distribuito in ITALIA da
Li StarFish S.r.l.
 Via Cavour, 35
 20063 Cernusco S/N (MI)
 telefono 02-92150794
 fax 02-92157285
 info@listarfish.it
 www.listarfish.it