

Instructions for use / Gebrauchsanweisung**IL-6-ELISA**

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

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 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

IL E-3231

 96

Microtiterplate – Ready for use

Content: Microtiterplate with 96 anti-IL-6 (monoclonal antibodies) coated wells

IL E-3240

CONJUGATE

Conjugate – Ready for use

Content: HRP labelled anti-IL-6 (monoclonal antibodies) in Borate buffer with bovine serum albumin and thymol

Volume: 1 x 11 ml

Calibrators and Controls – lyophilized

Cat. no.	Component	Calibrator/Control	
IL E-3201	CAL 0	Calibrator 0	1 vial
IL E-3202	CAL 1	Calibrator 1	1 vial
IL E-3203	CAL 2	Calibrator 2	1 vial
IL E-3204	CAL 3	Calibrator 3	1 vial
IL E-3205	CAL 4	Calibrator 4	1 vial
IL E-3206	CAL 5	Calibrator 5	1 vial
IL E-3251	CONTROL 1	Control 1	1 vial
IL E-3252	CONTROL 2	Control 2	1 vial

Content: **(See exact values on vial labels)**

in human plasma with bovine serum albumin, benzamidine and thymol

Preparation: **Add** 1 ml distilled water.

IL E-3260 **DILUENT** **Specimen Diluent** – lyophilized

Content: Human plasma with bovine serum albumin, benzamidine and thymol

Volume: 2 vials

Preparation: **Add** distilled water (see on the label for the exact volume).

IL E-3213 **INC-BUFF** **Incubation Buffer** – **Ready** for use

Content: Borate buffer with bovine serum albumin, benzamidine and thymol

Volume: 1 x 11 ml

IL E-3030 **WASH-CONC 200x** **Wash Solution** – 200x concentrated

Content: Wash Solution (TRIS-HCl)

Volume: 1 x 10 ml

Preparation: **Dilute** 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).

Hazard identification:



H317 May cause an allergic skin reaction.

IL E-3055 **SUBSTRATE** **Chromogenic TMB Solution** – **Ready** for use

Content: Chromogenic TMB Solution

Volume: 1 x 25 ml

IL E-3280 **STOP-SOLN** **Stop Solution** – **Ready** for use

Content: 2 N HCl

Volume: 1 x 12 ml

Hazards identification:



H290 May be corrosive to metal.

Note:

1. Use the *Specimen Diluent* for sample dilution.
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)

6. REAGENT PREPARATION

Calibrators:

Reconstitute the calibrators with 1 ml distilled water.

Controls:

Reconstitute the controls with 1 ml distilled water.

Specimen Diluent:

Reconstitute *Specimen Diluent* to the volume specified on the vial label with distilled water.

Working Wash solution:

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

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

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 – 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 12.5 (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.
- Each well can only be used once.

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 – 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

10.1 Polychromatic Reading

1. In this case, the 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 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.

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. Plot the OD values (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of IL-6 (abscissa) and draw a calibrator curve through the calibrator points.
4. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibrator 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 calibrator 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

12.1 Detection Limit

Twenty Calibrator 0 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.

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.

IL-6 conc. (pg/ml)	IL-6 measured with 100 ng/ml of sIL6R (pg/ml)	IL-6 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 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*.

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 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.

For more information, see Safety Data Sheet (SDS).

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

	Calibrator (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 µl 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 µl 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).		

The manufacturer can offer you the possibility of acquiring a protocol adapted for this kit to be used on the Stratec Gemini 2PS + Combo platform including protocol assay file, reagent file and tips for the good use of the kit on the instrument.

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Use-by date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE marking of conformity
	Caution		Catalogue number		Distributor
	Date of manufacture				

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

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

4. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

IL E-3231

 96

Microtiterplate – gebrauchsfertig

Inhalt:

Mikrotiterplatte mit 96 anti-IL-6 beschichteten Wells

IL E-3240

 CONJUGATE

Conjugate – gebrauchsfertig

Inhalt:

Konjugat: MRP markierte anti-IL-6 (monoklonaler Antikörper) in Boratpuffer mit Rinderserumalbumin und Thymol

Volumen:

1 x 11 ml

Kalibratoren und Kontrollen – lyophilisiert

Artikelnr.	Komponente	Kalibrator/Kontrolle	
IL E-3201	CAL 0	Kalibrator 0	1 Fläschchen
IL E-3202	CAL 1	Kalibrator 1	1 Fläschchen
IL E-3203	CAL 2	Kalibrator 2	1 Fläschchen
IL E-3204	CAL 3	Kalibrator 3	1 Fläschchen
IL E-3205	CAL 4	Kalibrator 4	1 Fläschchen
IL E-3206	CAL 5	Kalibrator 5	1 Fläschchen
IL E-3251	CONTROL 1	Kontrolle 1	1 Fläschchen
IL E-3252	CONTROL 2	Kontrolle 2	1 Fläschchen

Inhalt:

(Genaue Werte auf dem Etikett)

Kalibrator/Kontrolle: in Humanplasma mit Rinderserumalbumin und Thymol

Vorbereitung: 1 ml destilliertes Wasser **zugeben**.

IL E-3260

DILUENT

Specimen Diluent – lyophilisiert

Inhalt: Probenverdünner: Humanplasma mit Rinderserumalbumin, Benzamidin und Thymol

Volumen: 2 Flaschen

Vorbereitung: Destilliertes Wasser **zugeben** (exaktes Volumen bitte dem Etikett entnehmen).

IL E-3213

INC-BUFF

Incubation Buffer – gebrauchsfertig

Inhalt: Inkubationspuffer: Boratpuffer mit Rinderserumalbumin, Benzamidin und Thymol

Volumen: 1 x 11 ml

IL E-3030

WASH-CONC 200x

Wash Solution – 200x konzentriert

Inhalt: Waschlösung (TRIS-HCl)

Volumen: 1 x 10 ml

Vorbereitung: 200 x mit destilliertem Wasser **verdünnen** (Magnetrührer benutzen).

Mögliche Gefahren:



H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

IL E-3055

SUBSTRATE

Chromogenic TMB Solution – gebrauchsfertig

Inhalt: Chromogene TMB-Lösung

Volumen: 1 x 25 ml

IL E-3280

STOP-SOLN

Stop Solution – gebrauchsfertig

Inhalt: Stopplösung: 2 N HCl

Volumen: 1 x 12 ml

Mögliche Gefahren:



H290 Kann gegenüber Metall korrosiv sein.

Bemerkung:

1. Benutzen Sie den Specimen Dilution (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)

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Calibrators (Kalibratoren):

Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 1 ml destilliertem Wasser.

Controls (Kontrollen):

Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 1 ml destilliertem Wasser.

Specimen Diluent (Probenverdünner):

Rekonstituieren Sie den Probenverdünner bis zu dem genau auf dem Etikett des Fläschchens angegebenen Volumen mit dest. Wasser.

Working Wash solution (Waschlösung):

Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil *Waschlösung (200x)* mit 199 Anteilen destilliertem Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Werfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages weg.

7. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

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

8. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

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

9. DURCHFÜHRUNG

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 – 25 °C).
- Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.
- Führen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben doppelt aus. Vertikale Ausrichtung wird empfohlen.
- Verwenden Sie zur Zubereitung der Waschlösung einen reinen Kunststoffbehälter.
- Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Verwenden Sie zur Pipettierung der chromogenen Lösung und der Stopplösung keine Pipetten mit Metallteilen.
- Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.
- Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.
- Zur Vermeidung von Drift muss die Zeit zwischen dem Pipettieren des ersten Kalibrators und der letzten Probe auf die Zeit beschränkt werden, die in Kapitel 12.5 (Zeitverzögerung) erwähnt wird.
- Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibratorkurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.
- Pipettieren Sie die chromogene Lösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte.
- Während der Inkubation mit der chromogenen Lösung ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.
- Jedes Well kann nur einmal verwendet werden.

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 bis 8 °C gelagert werden.
2.	Befestigen Sie die Streifen im Halterahmen.
3.	Pipettieren Sie jeweils 50 µl Inkubationspuffer in alle Wells.
4.	Pipettieren Sie jeweils 100 µl Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Wells.
5.	Inkubieren Sie 1 Stunde bei Raumtemperatur (18 – 25 °C) auf dem horizontalen Schüttler bei 700 rpm $\pm$ 100 rpm.
6.	Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
7.	Waschen Sie die Platte dreimal: – Pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jedes Well. – Saugen Sie den Inhalt jedes Wells ab.
8.	Pipettieren Sie 100 µl anti-IL-6-HRP-Konjugat und 50 µl Probenverdünner in jedes Well.
9.	Inkubieren Sie 1 Stunde bei Raumtemperatur (18 – 25 °C) auf dem horizontalen Schüttler bei 700 rpm $\pm$ 100 rpm.
10.	Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
11.	Waschen Sie die Platte dreimal: – Pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jedes Well. – Saugen Sie den Inhalt jedes Wells ab.
12.	Pipettieren Sie 200 µl der chromogenen Lösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jedes Well.
13.	Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 15 Minuten bei Raumtemperatur (18 – 25 °C) auf dem horizontalen Schüttler bei 700 rpm $\pm$ 100 rpm. Vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
14.	Pipettieren Sie 100 µl der Stopplösung in jedes Well.
15.	Werten Sie die Absorptionen bei 450 nm und 490 nm (Referenzfilter 630 nm oder 650 nm) innerhalb 3 Stunden aus und berechnen Sie die Resultate wie in Kapitel 10 beschrieben.

10. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

10.1 Polychromatische Auswertung

1. In diesem Fall werden die Daten durch die 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 steuert das Lesegerät automatisch und integriert beide Auswertungen in ein polychromatisches Modell. Diese Technik kann ODs bis 10⁶ erstellen.
5. Das Prinzip der polychromatischen Datenauswertung funktioniert wie folgt:
 - X_i = OD bei 450 nm
 - Y_i = OD bei 490 nm
 - Standard nicht gewichtet lineare Regression, Parameter A & B werden berechnet: $Y = A \cdot X + B$
 - Wenn $X_i < 3$ OD-Einheiten, dann X berechnet = X_i
 - Wenn $X_i > 3$ OD-Einheiten, dann X berechnet = $(Y_i - B)/A$
 - Die Kalibrationskurve wird unter Verwendung einer 4 Parameter logistischen Kurve erstellt.
 - Die IL-6-Konzentration in den Proben wird durch Interpolation auf der Kalibrationskurve bestimmt.

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 die OD-Werte (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende IL-6 Konzentration (Abszisse) auf und zeichnen Sie eine Kalibrationskurve durch die Kalibrationspunkte.
4. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Kalibrationskurve.
5. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer "4 Parameter"-Kurvenfunktion.

11. TYPISCHE WERTE

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

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

12. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

12.1 Nachweisgrenzen

Zwanzig Kalibrator 0 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.

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

Es wurde keine Interferenz festgestellt.

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.

Weitere Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (SDS).

16. LITERATUR

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. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	Kalibratoren (µl)	Probe(n) / Kontrollen (µl)
Inkubationspuffer Kalibratoren (0 – 5) Proben, Kontrollen	50 100 –	50 – 100
1 Stunde bei Raumtemperatur (18 – 25 °C) unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren. Inhalt jedes Wells absaugen. Dreimal mit 400 µl Waschlösung waschen und absaugen.		
Anti-IL-6 -HRP Konjugat Probenverdünner	100 50	100 50
1 Stunde bei Raumtemperatur (18 – 25 °C) unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren. Inhalt jedes Wells absaugen. Dreimal mit 400 µl Waschlösung waschen und absaugen.		
Chromogene Lösung	200	200
15 Minuten bei Raumtemperatur (18 – 25 °C) unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren.		
Stopplösung	100	100
Auf einem Mikrotiterplatten-Lesegerät auswerten und Absorption jedes Well bei 450 nm (und 490 nm) gg. 630 nm (oder 650 nm) vermerken.		

Der Hersteller bietet Ihnen die Möglichkeit, ein für dieses Kit angepasstes Protokoll für die Verwendung auf der Stratec Gemini 2PS + Combo-Plattform zu erwerben, einschließlich Protokoll-Assay-Datei, Reagenzien-Datei und Tipps für die ordnungsgemäße Verwendung des Kits auf dem Instrument.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis		Chargennummer		In vitro Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten		Inhalt		CE-Kennzeichnung
	Achtung		Katalognummer		Vertriebspartner
	Herstellungsdatum				