



Instructions for Use

IL-1 β ELISA

IVD

CE

REF EIA-4437

Σ 96



DRG

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße 18, 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



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 versión válida de la metodico técnico incluido aquí en el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis

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.....	6
12	PERFORMANCE AND LIMITATIONS	7
13	INTERNAL QUALITY CONTROL.....	8
14	REFERENCE INTERVALS	8
15	PRECAUTIONS AND WARNINGS	8
16	BIBLIOGRAPHY.....	9
17	SUMMARY OF THE PROTOCOL.....	9
1	VERWENDUNGSZWECK.....	10
2	KLINISCHER HINTERGRUND	10
3	GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG	10
4	MITGELIEFERTE REAGENZIEN.....	11
5	ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL	11
6	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN.....	11
7	AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN.....	12
8	PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG	12
9	DURCHFÜHRUNG	12
10	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	13
11	TYPISCHE WERTE	13
12	LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK	14
13	INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE	15
14	REFERENZ INTERVALLE	15
15	VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN	15
16	LITERATUR	16
17	ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS	16

1	BUT DU DOSAGE.....	17
2	CONTEXTE CLINIQUE	17
3	PRINCIPES DU DOSAGE	17
4	REACTIFS FOURNIS	18
5	MATERIEL NON FOURNI.....	18
6	PREPARATION DES REACTIFS.....	18
7	STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS	19
8	PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON	19
9	MODE OPERATOIRE	19
10	CALCUL DES RESULTATS.....	20
11	DONNEES TYPES.....	20
12	PERFORMANCE ET LIMITES.....	21
13	CONTROLE DE QUALITE INTERNE	22
14	VALEURS ATTENDUES.....	22
15	PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS	22
16	BIBLIOGRAPHIE.....	23
17	RESUME DU PROTOCOLE	23
	SYMBOLS USED.....	24

1 INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the **in vitro** quantitative measurement of human Interleukin 1 β (IL-1 β) in serum and plasma.

2 CLINICAL BACKGROUND

2.1 Biological activities

Human interleukin-1 (IL-1) is a key mediator of the host response to various infectious, inflammatory and immunologic challenges. Two distinct polypeptides, IL-1 α and IL-1 β , mediate IL-1 biological activities and bind to the same cell surface receptor. Both are initially synthesized as 31-kDa intracellular precursors that are subsequently found as mature proteins of 17 kDa in monocyte supernates. Membrane-bound IL-1 has also been described and may account for a part of IL-1 mediated local effects. The primary sources of IL-1 are blood monocytes and tissue macrophages. Other specialized cells such as T- and B-lymphocytes, various epithelial, endothelial and some mesenchymal cells can also produce IL-1.

IL-1 β is the major form secreted by monocytes and macrophages which are believed to be the main source of circulating (plasma) IL-1. Inhibitions of IL-1 activity have been described in plasma and other biological fluids. IL-1 affects several unrelated tissues and is a main mediator of the "acute phase" inflammatory responses characterised by alterations in metabolic, endocrinologic and immunologic functions. This cytokine has an essential role in T-cell activation, providing one of the necessary signals for IL-2 (T-cell growth factor) production. It is the main mediator of inflammatory processes by acting on the nervous system (fever, sleep, anorexia), on bone marrow-derived cells (chemotaxis and/or activation of neutrophils, monocytes and lymphocytes) and on various tissues (fibroblast proliferation, resorption of cartilage and bone matrices, glial cell proliferation, stimulation of endothelial cell procoagulant activity, etc.). Most of these activities are directly attributable to IL-1 β , but others are mediated in collaboration with other cytokines such as IL-6, interferons, and tumor necrosis factor. IL-1 stimulates the production or acts synergistically with these cytokines and the final biological activity is thus the result of a network of interactions between these various mediators.

2.2 Clinical application

The biological properties of IL-1 β and its key role in inflammatory processes suggest its involvement in the pathogenesis of many diseases. Indeed, high amounts of IL-1 are found in the joint effusions of some patients with rheumatoid and non-rheumatoid inflammatory joint diseases, in infectious pleural or peritoneal fluids, and in the drainage fluid of patients undergoing chronic diabetes, periodontal diseases, etc. Although little or no IL-1 β is normally detected in human plasma or serum obtained from healthy, rested human subjects, elevated levels have been reported in the circulation of febrile or septic patients, in patients with Crohn's disease, during graft rejection, in healthy volunteers after extended exercise and in women following ovulation. Studies based on *in vitro* production of IL-1 by isolated blood leukocytes have demonstrated reduced IL-1 production in malnourished patients and cancer patients with large tumor burdens. Hence, this immunoassay for IL-1 β is an important tool to study macrophage activation and to investigate the role of IL-1 β in various (physiological or pathological) immune and inflammatory processes.

3 PRINCIPLES OF THE METHOD

The IL-1 β ELISA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on microtiter plate. The assay uses monoclonal antibodies (MAbs) directed against distinct epitopes of IL-1 β . 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-1 β – MAb 2 – HRP, the microtiter plate 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 microtiter plate 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-1 β concentration.

A calibration curve is plotted and IL-1 β 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-1 β (monoclonal antibodies) coated wells	PLATE	96 wells	Ready for use
Conjugate: HRP labelled anti- IL-1 β (monoclonal antibodies) in TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin and thymol	Ab HRP	1 vial 6 mL	Ready for use
Calibrator N = 0 to 5 (see exact values on vial labels) in human serum, benzamidin and thymol	CAL N	6 vials lyophil.	Add 2.0 mL distilled water
Specimen Diluent: human serum, benzamidin and thymol	DIL SPE	3 vials lyophil.	Add distilled water. (See on the label for the exact volume)
Wash Solution (Tris-HCl)	WASH SOLN CONC	1 vial 10 mL	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
Controls - N = 1 or 2 in hum an serum, benzamidin and thymol	CONTROL N	2 vials lyophil.	Add 2.0 mL distilled water
Chromogen TMB (Tetramethylbenzydine)	CHROM TMB	1 vial 25 mL	Ready for use
Stopping solution: HCl 1.0 N	STOP SOLN	1 vial 12 mL	Ready for use

Note: 1. Use the specimen diluent for sample dilutions.
 2. 1 pg of the calibrator preparation is equivalent to 100 mIU of the NIBSC 1st IS 86/680.

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 μ L, 200 μ L, 1 mL and 10 mL (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Horizontal microtiter plate shaker capable of 700 rpm \pm 100 rpm
6. Washer for Microtiter plates
7. Microtiter plate 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

A. Calibrators:

Reconstitute the calibrators with 2.0 mL distilled water.

B. Controls:

Reconstitute the controls with 2.0 mL distilled water.

C. Specimen Diluent:

Reconstitute the 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 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 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-1 β production by blood cells and thus falsely increase plasma IL-1 β values.
- Collection tubes must be pyrogen-free. Plasma can be collected on sterile EDTA and rapidly separated after centrifugation. The use of heparin tubes is discouraged as batches of heparin are often contaminated with pyrogen.

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 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 11.5 (Time delay). Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs. The Chromogenic Solution should be colourless. If a blue colour develops within a few minutes after preparation, this indicates that the reagent is unusable, and must be discarded. 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 200 μ L of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
4. Pipette 50 μ L of anti- IL-1 β -HRP conjugate into all the wells.
5. Incubate for 2 hours at 18 °C - 25 °C on a horizontal shaker set at 700 rpm \pm 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 200 μ L of the Chromogenic Solution into each well within 15 minutes following the washing step.
9. Incubate the microtiter plate for 15 minutes at 18 °C - 25 °C on a horizontal shaker set at 700 rpm \pm 100 rpm, avoid direct sunlight.
10. Pipette 100 μ L of Stop Solution into each well.
11. 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-1 β 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-1 β (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-1 β -ELISA		OD units Polychromatic model
Calibrator	0 pg/mL	0.013
	24 pg/mL	0.121
	89 pg/mL	0.336
	320 pg/mL	1.042
	574 pg/mL	1.693
	1166 pg/mL	2.704

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 standard deviations above the average OD at zero binding, was 0.35 pg/mL.

12.2 Specificity

No significant cross-reaction was observed in presence of 500 ng/mL of IL-1 α , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , TNF- β , IFN- β , IFN- γ , TGF- β , GM-CSF, OSM, MIP-1 α , MIP-1 β , LIF, MCP-1, G-CSF, RANTES.

This IL-1 β assay is specific for human natural and recombinant IL-1 β .

12.3 Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	$<X> \pm SD$ (pg/mL)	CV (%)	Serum	N	$<X> \pm SD$ (pg/mL)	CV (%)
A	10	127 \pm 3	2.3	A	20	120 \pm 6	4.9
B	10	733 \pm 11	1.4	B	20	549 \pm 14	2.5

12.4 Accuracy

RECOVERY TEST

Sample	Added IL-1 β (pg/mL)	Recovered IL-1 β (pg/mL)	Recovery (%)
Serum	1282	1196	93
	605	542	90
	329	314	95
	157	131	84
	72	64	89
	31	28	92
Plasma	1282	1208	94
	605	573	95
	329	321	97
	157	146	93
	72	67	92
	31	29	94

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (pg/mL)	Measured Concent. (pg/mL)
Serum	1/1	-	1197
	1/2	598	637
	1/4	299	320
	1/8	150	164
	1/16	75	86
	1/32	37	41
Plasma	1/1	-	688
	1/2	344	336
	1/4	172	172
	1/8	86	87
	1/16	43	51
	1/32	26	22
	1/64	13	9
	1/128	4	4

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				
	T0	10 min	20 min	30 min
1	1485	1575	1553	1647
2	1123	1129	1150	1228
4	592	572	595	606
5	375	391	375	375
6	1454	1429	1438	1605
500	641	583	645	658
1000	1107	1087	1158	1158
1500	1440	1261	1399	1425

12.6 Hook effect

A sample spiked with IL-1 β up to 1 μ g/mL gives higher OD's than the last calibrator point.

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 mean of 22 normal serum samples was 5.4 pg/mL (SD = 3.9), ranging between 0 pg/mL and 13.6 pg/mL. This study was performed on samples from apparently healthy persons with low CRP levels. For guidance, the mean of 103 normal plasma was 2.6 pg/mL (SD = 5.3), ranging between 0 pg/mL and 17 pg/mL (based on 2.5% to 97.5% percentiles). This study was performed with samples collected in strict sampling condition.

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. OPPENHEIM J.J. and GERY I., (1982). Interleukin-1 is more than an interleukin. Immunology Today, 3:113-119.
2. MIZEL S.B., (1982). Interleukin-1 and T-cell activation. Immunol. Rev., 63:51-71.
3. DINARELLO C.A., (1984). Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute phase response. N. Eng. J. Med., 311:1413-1418.
4. DINARELLO C.A., (1985). An update on human interleukin-1 : from molecular biology to clinical relevance. J. Clin. Immunol., 5:287-297.
5. BAILLY, S. et al., (1994) Comparative production of IL-1 β and IL-1 α by LPS-stimulated human monocytes: ELISAs measurement revisited. Cytokine, 6:111-115.
6. DINARELLO C.A., (1988) Biology of interleukin-1. FASEB J., 2:108-115.

17 SUMMARY OF THE PROTOCOL

	CALIBRATORS (μ L)	SAMPLE(S) CONTROLS (μ L)
Calibrators (0-5)	200	-
Samples, Controls	-	200
Anti-IL-1 β - HRP conjugate	50	50
<p>Incubate for 2 hours at 18 °C - 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.</p>		
Chromogenic Solution	200	200
<p>Incubate for 15 min at 18 °C - 25 °C with continuous shaking at 700 rpm.</p>		
Stop Solution	100	100
<p>Read on a microtiter plate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (and 490 nm) versus 630 (or 650 nm)</p>		

1 VERWENDUNGSZWECK

Ein immunenzymetrisches Assay für die quantitative **in vitro** Bestimmung von humanem Interleukin 1 β (IL-1 β) in Serum und Plasma.

2 KLINISCHER HINTERGRUND

17.1 Biologische Aktivität

Humanes Interleukin-1 (IL-1) ist der Schlüsselmediator für die Entzündungsantwort Antwort auf unterschiedliche infektiöse, entzündliche oder immunologische Abläufe. Zwei verschiedene Polypeptide, IL-1 α und IL-1 β , sind als Mediatoren verantwortlich für die biologischen Aktivitäten von IL-1 und binden am selben Oberflächenrezeptor der Zelle. Beide sind ursprünglich synthetisiert als 31-kDa intrazelluläre Zwischenprodukte, die anschließend als reife Proteine von 17 kDa im Monozytenüberstand gefunden werden. Membrangebundenes IL-1 wurde auch so beschrieben und ist möglicherweise für einen Teil der durch IL-1 vermittelten lokalen Effekte verantwortlich. Die ursprünglichen Quellen des IL-1 sind Blutmonozyten und Gewebsmakrophagen. Andere spezialisierte Zellen wie T- und B-Lymphozyten, unterschiedliche epitheliale, endotheliale und einige mesenchymale Zellen können ebenfalls IL-1 produzieren. IL-1 β ist die Hauptform, sekretiert von Monozyten und Makrophagen, welche als Hauptquelle des zirkulierenden (Plasma) IL-1 angesehen werden. Unterdrückungen der Aktivität von IL-1 wurden bei Plasma und anderen biologischen Flüssigkeiten beschrieben. IL-1 beeinflusst verschiedene unverbundene Gewebe und ist ein Hauptvermittler der "akuten Phase" der inflammatorischen Antwort des Organismus, die charakterisiert wird durch die Veränderung der metabolischen, endokrinologischen und immunologischen Funktionen. Dieses Zytokin spielt eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der T-Zellen, indem es eines der notwendigen Signale für die Produktion von IL-2 (T-Zell-Wachstumsfaktor) induziert. Es ist der Hauptmediator entzündlicher Prozesse, indem es auf das Nervensystem (Fieber, Schlaf, Appetitlosigkeit), auf die Knochenmarkszellen (Chemotaxis, und/oder Aktivierung der Neutrophele, Monozyten und Lymphozyten) und auf verschiedene Gewebe (Proliferation des Fibroblasts, Resorption von Knorpel und Knochenkittsubstanz, Proliferation der Gliazelle, Stimulation der Prokoagulanzaktivität der endothelialen Zelle etc.) einwirkt. Die meisten dieser Aktivitäten werden direkt IL-1 β zugeschrieben, aber andere werden in Zusammenarbeit mit anderen Zytokinen wie IL-6, Interferonen und dem Tumor-Nekrose-Faktor vermittelt.

IL-1 stimuliert die Produktion oder wirkt synergistisch mit diesen Zytokinen, wonach die letztendliche biologische Aktivität das Resultat des Netzwerks der Interaktionen zwischen den verschiedenen Mediatoren ist.

17.2 Klinische Anwendung

Die biologischen Eigenschaften des IL-1 und seine Schlüsselrolle bei entzündlichen Prozessen legt seine Involvierung bei der Pathogenese vieler Krankheiten nahe. In der Tat wurden hohe Werte von IL-1 in Gelenkergüssen einiger Patienten mit rheumatischen oder nicht-rheumatischen, entzündlichen Gelenkerkrankungen, bei Infektionen pleuraler oder peritonealer Flüssigkeiten, in der Drainageflüssigkeit von Patienten, die an chronischer Diabetes leiden, bei parodontalen Erkrankungen etc. gefunden. Obgleich wenig oder kein IL-1 β in humanem Plasma oder Serum, das von gesunden, ausgeruhten menschlichen Subjekten entnommen wurde, gefunden wird, wird von erhöhten Werten im Kreislauf von fiebrigen oder septischen Patienten, Patienten mit Crohn-Krankheit, während Transplantatabstoßung, bei gesunden Freiwilligen nach schwerer körperlicher Anstrengung und bei Frauen nach dem Eisprung berichtet. Studien, die auf der *in vitro* Produktion von IL-1 mittels isolierter Blutleukozyten basieren, haben eine reduzierte Produktion von IL-1 bei schlecht ernährten Patienten und solchen, die unter großen Krebstumoren leiden, gezeigt. Daher ist dieser Immunoassay für IL-1 β ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung der Makrophagenaktivierung und zur Erforschung der Rolle des IL-1 β bei verschiedenen (physiologischen oder pathologischen) Immun- und Entzündungsprozessen.

3 GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der IL-1 β -ELISA ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay (EASIA) im Mikrotiterplattenformat. Der Assay benutzt monoklonale Antikörper (MAbs), die gegen verschiedene Epitope von IL-1 β 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-1 β - MAk 2 - MRP; nicht gebundene enzymbeschriftete Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Gebundene enzymbeschriftete Antikörper werden durch eine Farbreaktion gemessen. Farblösung (TMB - H₂O₂) wird hinzugefügt und inkubiert. Die Reaktion wird durch Hinzufügen einer Stoplösung beendet und die Mikrotiterplatte wird bei adäquater Wellenlänge ausgewertet. Die Menge an Substratumsatz wird kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die proportional zur IL-1 β -Konzentration ist.

Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die IL-1 β -Konzentration in den Proben wird durch Interpolation von der Kalibrationskurve bestimmt.

Die Verwendung des EASIA-Lesegeräts (Linearität bis zu 3 OD-Einheiten) und eine komplexe Datenreduktionsmethode (polychromatische Datenreduktion) ergeben eine hohe Sensibilität im niedrigen Bereich und einen breiten Kalibrationsbereich.

4 MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien		96 Test Kit	Rekonstitution
Mikrotiterplatte mit 96 anti IL-1 β -beschichtete Wells (monoklonale Antikörper)		96 Wells	gebrauchsfertig
Konjugat: MRP markiertes Anti IL-1 β (monoklonale Antikörper) in TRIS-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin und Thymol	Ab HRP	1 Gefäß 6 mL	gebrauchsfertig
Kalibrator- N = 0 bis 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanserum mit Benzamidin und Thymol	CAL N	6 Gefäße lyophilisiert	2,0 mL dest. Wasser zugeben
Probenverdünner Humanserum mit Benzamidin und Thymol	SIL SPE	3 Gefäße lyophilisiert	Dest. Wasser zugeben (das exakte Volumen bitte dem Etikett entnehmen)
Waschlösung (Tris-HCl)	WASH SOLN CONC	1 Gefäß 10 mL	200 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetührer benutzen).
Kontrollen - N = 1 oder 2 Humanserum mit Benzamidin und Thymol	CONTROL N	2 Gefäße lyophilisiert	2,0 mL dest. Wasser zugeben
Chromogenes TMB (Tetramethylbenzydin)	CHROM TMB	1 Gefäß 25 mL	gebrauchsfertig
Stopplösung: HCl 1,0 N	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 86/680

5 ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

1. Hochwertiges destilliertes Wasser
2. Pipetten: 50 μ L, 200 μ L, 1 mL und 10 mL (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegplastikspitzen wird empfohlen)
3. Vortex Mixer
4. Magnetührer
5. Horizontaler Schüttler für Mikrotiterplatte Kap. 700 rpm \pm 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

A. Kalibratoren: Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 2 mL dest. Wasser.

B. Kontrollen: Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 2 mL dest. Wasser.

C. Probenverdünner:

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

D. Waschlösung:

Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (200x) mit 199 Anteilen dest. Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetührer 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 - 8 °C stabil.
- Nicht verwendete Mikrotiterstreifen sollten bis zum Verfallsdatum dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2 °C - 8 °C gelagert werden.
- Nach der Rekonstitution sind die Kalibratoren, Kontrollen und Probenverdünner 4 Tage stabil bei 2 °C - 8 °C. 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 18 °C - 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 und bei 2 °C - 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 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-1 β Produktion durch Blutzellen stimulieren und somit Plasma IL-1 β Werte fälschlich steigern könnten, zu vermeiden.
- Sammelröhrchen dürfen kein Pyrogen enthalten. Plasma kann mit sterilen EDTA gesammelt und nach der Zentrifugation schnell getrennt werden. Vom Gebrauch von Heparin-Röhrchen wird abgeraten, da Heparin-Chargen des Öfteren mit Pyrogen kontaminiert sind.

9 DURCHFÜHRUNG

17.3 Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum.

Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht.

Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf 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 reinen Kunststoffbehälter.

Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.

Verwenden Sie zur Pipettierung der Substratlösung 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 11.5 (Zeitverzögerung) erwähnt wird.

Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

Pipettieren Sie die Substratlösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte.

Während der Inkubation mit der Substratlösung ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

17.4 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 - 8 °C gelagert werden.
2. Befestigen Sie die Streifen im Halterahmen.
3. Pipettieren Sie jeweils 200 μ L Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Wells.
4. Pipettieren Sie 50 μ L Anti- IL-1 β -MRP-Konjugat in alle Wells.
5. Inkubieren Sie 2 Stunden bei 18 °C - 25 °C auf horizontalem 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 200 μ L der Substratlösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jedes Well.
9. Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 15 Minuten bei 18 °C - 25 °C auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm \pm 100 rpm; Vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
10. Pipettieren Sie 100 μ L der Stopplösung in jedes Well.
11. 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

17.5 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 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:
 - $X_i = \text{OD bei } 450 \text{ nm}$
 - $Y_i = \text{OD bei } 490 \text{ nm}$
 - Standard nicht gewichtet lineare Regression, Parameter A & B werden berechnet: $Y = A \cdot X + B$
 - Wenn $X_i < 3 \text{ OD Einheiten}$, dann X berechnet = X_i
 - Wenn $X_i > 3 \text{ OD Einheiten}$, dann X berechnet = $(Y_i - B)/A$
 - Die Kalibrationskurve wird unter Verwendung einer 4 Parameter logistischen Kurve erstellt.
 - Die IL-1 β -Konzentration in den Proben wird durch Interpolation auf der Kalibrationskurve bestimmt.

17.6 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 den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration IL-1 β (Abszisse) 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 können nicht als Ersatz für die Echtzeitstandardkurve verwendet werden.

IL-1 β -ELISA		OD Einheiten Polychromatisches Modell
Kalibrator	0 pg/mL	0,013
	24 pg/mL	0,121
	89 pg/mL	0,336
	320 pg/mL	1,042
	574 pg/mL	1,693
	1166 pg/mL	2,704

12 LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

17.7 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 0,35 pg/mL.

17.8 Spezifität

Es wurde keine signifikante Kreuzreaktion beobachtet beim Vorhandensein von 50 ng von IL-1 α , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-a, TNF- β , IFN- β , IFN- γ , TGF- β , GM-CSF, OSM, MIP-1 α , MIP-1 β , LIF, MCP-1, G-CSF und RANTES.

Dieses IL-1 β Assay ist spezifisch für humanes natürliches und rekombinantes IL-1 β .

17.9 Präzision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	$<X> \pm SD$ (pg/mL)	CV (%)	Serum	N	$<X> \pm SD$ (pg/mL)	CV (%)
A	10	127 \pm 3	2,3	A	20	120 \pm 6	4,9
B	10	733 \pm 11	1,4	B	20	549 \pm 14	2,5

17.10 Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST

Probe	Zugeg. IL-1 β (pg/mL)	Wiedergef. IL-1 β (pg/mL))	Wiedergefunden (%)
Serum	1282	1196	93
	605	542	90
	329	314	95
	157	131	84
	72	64	89
	31	28	92
Plasma	1282	1208	94
	605	573	95
	329	321	97
	157	146	93
	72	67	92
	31	29	94

VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünnung	Theoret. Konzent. (pg/mL)	Gemessene Konzent. (pg/mL)
Serum	1/1	-	1197
	1/2	598	637
	1/4	299	320
	1/8	150	164
	1/16	75	86
	1/32	37	41
Plasma	1/1	-	688
	1/2	344	336
	1/4	172	172
	1/8	86	87
	1/16	43	51
	1/32	26	22
	1/64	13	9
	1/128	4	4

Die Proben wurden mit Probenverdünner verdünnt.

17.11 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 des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugegeben wird.

ZEITDIFFERENZ				
	T0	10 min	20 min	30 min
1	1485	1575	1553	1647
2	1123	1129	1150	1228
4	592	572	595	606
5	375	391	375	375
6	1454	1429	1438	1605
500	641	583	645	658
1000	1107	1087	1158	1158
1500	1440	1261	1399	1425

17.12 Hook-Effekt

Eine Probe mit IL-1 β bis zu 1 μ g/mL liefert höhere Messwerte als der letzte Kalibratormesswert.

13 INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Sollwerten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte. Kontrollen mit erhöhten Azidkonzentrationen stören die Enzymreaktion und können nicht verwendet werden.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.
- Es wird empfohlen, Kontrollen im Assay routinemäßig wie unbekannte Proben zu behandeln, um die Assayvarianz zu messen. Die Leistung des Assay muss mit den Qualitätskontrollkarten der Kontrollen überprüft werden.
- Es hat sich bewährt, die durch den Computer ausgewählte Kurvenanpassung visuell zu überprüfen.

14 REFERENZ INTERVALLE

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

Zur Orientierung:

Der Mittelwert von 22 normalen Serumproben lag bei 5,4 pg/mL (SD = 3,9), Werte zwischen 0 pg/mL und 13,6 pg/mL. Diese Studie wurde durchgeführt mit Proben von anscheinend gesunden Personen mit niedrigen CRP Werten. Der Mittelwert von 103 normalen Plasmaproben, gesammelt unter strengen Sammelbedingungen lag bei 2,6 pg/mL (SD = 5,3), Werte zwischen 0 pg/mL und 17 pg/mL (auf Basis der 2,5% und 97,5% Perzentile).

15 VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

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

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde. Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiös betrachtet werden.

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

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

16 LITERATUR

1. OPPENHEIM J.J. and GERY I., (1982). Interleukin-1 is more than an interleukin. Immunology Today, 3:113-119.
2. MIZEL S.B., (1982). Interleukin-1 and T-cell activation. Immunol. Rev., 63:51-71.
3. DINARELLO C.A., (1984). Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute phase response. N. Eng. J. Med., 311:1413-1418.
4. DINARELLO C.A., (1985). An update on human interleukin-1 : from molecular biology to clinical relevance. J. Clin. Immunol., 5:287-297.
5. BAILLY, S. et al., (1994) Comparative production of IL-1 β and IL-1 α by LPS-stimulated human monocytes : ELISAs measurement revisited. Cytokine, 6:111-115.
6. DINARELLO C.A., (1988) Biology of interleukin-1. FASEB J., 2:108-115.

17 ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	KALIBRATOREN (μ L)	PROBE(N) KONTROLLEN (μ L)
Kalibratoren (0-5)	200	-
Proben, Kontrollen	-	200
Anti-IL-1 β - MRP Konjugat	50	50
<p>2 Stunden bei 18 °C - 25 °C unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren. Inhalt jedes Wells absaugen. Dreimal mit 400 μL Waschlösung waschen und absaugen.</p>		
Substratlösung	200	200
<p>15 min bei 18 °C - 25 °C unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren.</p>		
Stopplösung	100	100
<p>Auf einem Mikrotiterplatten-Lesegerät auswerten und Absorption jedes Wells bei 450 nm (gg. 630 oder 650 nm) und 490 nm (gg. 630 oder 650 nm) vermerken.</p>		

1 BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage immuno-enzymatique pour la mesure quantitative in vitro de l'interleukine 1 β humaine (IL-1 β) dans le sérum et le plasma.

2 CONTEXTE CLINIQUE

2.1 Activités biologiques

L'interleukine-1 humaine (IL-1) est un médiateur-clé de la réponse de l'hôte à différentes infections, inflammations et défis immunologiques. Deux polypeptides distincts, les IL-1 α et IL-1 β , servent d'intermédiaires aux activités biologiques de l'IL-1 et se lient au même récepteur cellulaire de surface. Au départ, tous les deux sont synthétisés sous forme d'un précurseur intracellulaire de 31 kDa et se retrouvent ensuite dans le surnageant des monocytes sous forme de protéines matures de 17 kDa. De l'IL-1 liée au récepteur de membrane a été décrite et pourrait expliquer une partie des effets locaux auxquels l'IL-1 sert d'intermédiaire. Les sources primaires d'IL-1 sont les monocytes sanguins et les macrophages tissulaires. D'autres cellules spécialisées, comme les lymphocytes T et B, différentes cellules épithéliales, endothéliales et certaines cellules mésenchymateuses, peuvent également produire de l'IL-1. L'IL-1 β est la forme majeure sécrétée par les monocytes et les macrophages dont on croit qu'ils sont la source principale de l'IL-1 circulante (dans le plasma). Des inhibitions de l'activité de l'IL-1 ont été décrites dans le plasma et d'autres liquides biologiques. L'IL-1 agit sur différents tissus n'ayant aucun rapport les uns avec les autres et est le médiateur principal des réponses inflammatoires de « phase aiguë » caractérisées par des changements des fonctions métaboliques, endocriniennes et immunologiques. Cette cytokine joue un rôle essentiel dans l'activation des cellules T, fournissant un des signaux nécessaires à la production de l'IL-2 (facteur de croissance des cellules T). C'est le médiateur principal des processus inflammatoires par son action sur le système nerveux (fièvre, sommeil, anorexie), sur les cellules dérivées de la moelle osseuse (chimiotactisme) et/ou activation des neutrophiles, monocytes et lymphocytes) et différents tissus (prolifération des fibroblastes, résorption du cartilage et des matrices osseuses, prolifération des cellules gliales, stimulation de l'activité procoagulante des cellules endothéliales, etc.). La plupart de ces activités sont directement imputables à l'IL-1 β , mais d'autres sont médiées en collaboration avec d'autres cytokines comme l'IL-6, les interférons et le facteur de nécrose tumoral. L'IL-1 stimule la production ou agit en synergie avec ces cytokines et l'activité finale est donc le résultat d'un réseau d'interactions entre ces différents médiateurs.

2.2 Application clinique

Les propriétés biologiques de l'IL-1 β et son rôle clé dans les processus inflammatoires suggèrent sa participation dans la pathogenèse de nombreuses maladies. En effet, on trouve de grandes quantités d'IL-1 dans le liquide d'épanchement articulaire de certains patients atteints de maladies articulaires inflammatoires rhumatoïdes et non rhumatoïdes, dans les liquides d'infection pleuraux et péritonéaux et dans le liquide de drainage de patients atteints de diabète chronique, de maladies parodontales, etc. Bien que peu ou pas d'IL-1 β ne soit normalement détectée dans le plasma ou le sérum humain de sujets sains et au repos, des taux élevés ont été rapportés dans la circulation de patients fébriles ou infectés, chez des patients souffrant de la maladie de Crohn, lors du rejet de greffe, chez des volontaires sains après un exercice intense et chez la femme après l'ovulation. Des études basées sur la production in vitro d'IL-1 par des leucocytes isolés du sang ont montré une diminution de la production d'IL-1 chez des patients souffrant de mal nutrition et des patients cancéreux avec une entreprise tumorale étendue. Cet immuno-essai pour l'IL-1 β est donc un outil important pour étudier l'activation des macrophages et investiguer le rôle de l'IL-1 β dans différents processus immunitaires et inflammatoires (physiologiques et pathologiques).

3 PRINCIPES DU DOSAGE

Le kit DIAsource IL-1 β -ELISA est un « Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay » en phase solide effectué sur des microplaques. L'analyse utilise des anticorps monoclonaux (AcM) dirigés contre des épitopes distincts de l'IL-1 β . Les calibrateurs et les échantillons réagissent avec l'anticorps de capture monoclonal (AcM 1) recouvrant les puits et avec un anticorps monoclonal (AcM 2) marqué avec la peroxydase (HRP). Après une période d'incubation permettant la formation d'un sandwich: AcM 1 recouvert – IL-1 β – AcM 2 – HRP, la microplaquette est lavée afin d'enlever l'anticorps libre marqué enzymatiquement. L'anticorps lié marqué enzymatiquement est mesuré avec une réaction chromogénique. Une solution chromogénique (TMB – H₂O₂) est ajoutée et incubée. La réaction est arrêtée avec l'addition de Solution d'arrêt et la microplaquette est alors lue à la longueur d'onde appropriée. La quantité de remplacement de substrat est déterminée colorimétriquement par la mesure de l'absorbance, qui est proportionnelle à la concentration en IL-1 β .

Une courbe de calibration est dessinée et la concentration en IL-1 β dans les échantillons est déterminée par interpolation de la courbe de calibration. L'utilisation du lecteur ELISA (linéarité jusque 3 unités de DO) et une méthode de réduction de données sophistiquée (réduction de données polychromatique) résultent en une haute sensibilité dans la portée basse et en une portée de calibration étendue.

4 REACTIFS FOURNIS

Réactifs		96 tests Kit	Reconstitution
Microplaque de titration avec 96 puits recouverts d'anti IL-1 β (anticorps monoclonal)	PLATE	96 wells	Prêt à l'emploi
Conjugué: anti-IL-1 β marqué avec de l'HRP (anticorps monoclonal) dans un tampon TRIS-maléate avec de l'albumine bovine et du thymol	Ab HRP	1 flacon 6 ml	Prêt à l'emploi
Calibrateur N = 0 à 5 (cfr. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans du sérum humain avec de la benzamidine et du thymol	CAL N	6 flacons lyophilisés	Ajouter 2 ml d'eau distillée
Diluant du spécimen dans du sérum humain avec de la benzamidine et du thymol	DIL SPE	3 flacons lyophilisés	Ajouter de l'eau distillée (voir le volume exact sur l'étiquette)
Solution de Lavage (Tris-HCl)	WASH SOLN CONC	1 vial 10 mL	Diluer 200 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
Contrôles - N = 1 ou 2 dans du sérum humain avec de la benzamidine et du thymol	CONTROL N	2 flacons lyophilisés	Ajouter 2 ml d'eau distillée
Chromogène TMB (Tetramethylbenzydine)	CHROM TMB	1 flacon 25 ml	Prêt à l'emploi
Solution d'arrêt: HCl 1,0N	STOP SOLN	1 flacon 12 ml	Prêt à l'emploi

Note: 1. Utiliser le Diluant du spécimen pour la dilution des échantillons.
 2. 1 pg de la préparation du calibrateur est équivalent à 100 mIU du NIBSC 1st IS 86/680.

5 MATERIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

1. Eau distillée d'une haute qualité
2. Pipettes pour distribuer: 50 μ l, 200 μ l, 1 ml et 10 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes en plastique est recommandée)
3. Agitateur vortex
4. Agitateur magnétique
5. Agitateur de microplaques horizontal capable de 700 rpm \pm 100 rpm
6. Laveur de microplaques
7. Lecteur de microplaques capable de lire à 450 nm, 490 nm et 650 nm (en cas de lecture polychromatique) ou capable de lire à 450 nm et 650 nm (lecture monochromatique)

6 PREPARATION DES REACTIFS

A. Calibrateurs :

Reconstituer les calibrateurs avec 2 ml d'eau distillée.

B. Contrôles :

Reconstituer les contrôles avec 2 ml d'eau distillée.

C. Diluant du spécimen :

Reconstituer le Diluant du spécimen avec le volume d'eau distillée spécifié sur l'étiquette du flacon.

D. Solution de Lavage :

Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 199 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (200x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

7 STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Des barrettes inutilisées doivent être gardées, à 2-8°C, dans un sachet cacheté contenant un dessiccatant jusqu'à la date d'expiration.
- Après reconstitution, les calibrateurs, le Diluant du spécimen et les contrôles sont stables pendant 4 jours entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquotes devront être réalisées et celles-ci seront gardées à -20°C pendant 2 mois. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage concentrée est stable à 18-25°C jusqu'à la date d'expiration.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le conjugué est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

8 PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Le sérum doit être débarrassé le plus rapidement possible du caillot de globules rouges après coagulation et centrifugation. Il doit être conservé à 4°C. Si les échantillons ne sont pas tout de suite utilisés, ils doivent être conservés à -20°C, au maximum pendant 2 mois, et à -70°C pour une période plus longue (maximum un an).
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Avant l'utilisation des échantillons, ceux-ci doivent être amenés à 18-25°C. On recommande de vortexer les échantillons avant de les utiliser.
- Les conditions de la prise d'échantillon pouvant affecter les résultats, il faut prendre de strictes précautions pendant la prise d'échantillon afin d'éviter que des impuretés contenues dans le matériel de prélèvement ne stimulent la production d'IL-1 β par les cellules sanguines et ne fassent faussement augmenter les taux plasmatiques d'IL-1 β .
- Les tubes de prélèvement doivent être pyrogen-free. Le plasma peut être prélevé sur de l'EDTA stérile et rapidement séparé après centrifugation. L'utilisation de tubes héparinés n'est pas encouragée car les lots d'héparine sont souvent contaminés par des substances pyrogènes.

9 MODE OPERATOIRE

9.1 Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration.

Ne pas mélanger du matériel provenant de trousse de lots différents. Mettre tous les réactifs à 18-25°C avant utilisation.

Mélangez tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce.

Tester les calibrateurs, les contrôles et les échantillons en double. Un alignement vertical est recommandé.

Utiliser un récipient en plastique propre pour préparer la Solution de Lavage.

Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon.

Pour la distribution de la Solution Chromogénique et de la Solution d'arrêt, éviter des pipettes avec des parties en métal.

Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision.

Respecter les temps d'incubation.

Afin d'éviter des anomalies, le délai entre le pipetage du premier calibrateur et celui du dernier échantillon doit être limité au délai indiqué à la section XIII paragraphe E (Délai).

Préparer une courbe d'étalonnage pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

Distribuer la Solution Chromogénique dans les 15 minutes après le lavage de la microplaques de titration.

Eviter l'exposition à la lumière du soleil lors de l'incubation avec la Solution Chromogénique.

9.2 Mode opératoire

1. Sélectionner le nombre de barrettes nécessaires pour le test. Les barrettes inutilisées doivent être cachetées de nouveau dans le sachet avec un dessiccant et gardées à 2-8°C.
2. Placer les barrettes dans le support.
3. Pipeter 200 μ L de chaque Calibrateur, Contrôle et Echantillon dans les puits appropriés.
4. Pipeter 50 μ L du conjugué anti-IL-1 β -HRP dans tous les puits.
5. Incuber pendant 2 heures à 18-25°C dans un agitateur horizontal mis à 700 rpm \pm 100 rpm.
6. Aspirer le liquide de chaque puits.
7. Laver la plaque 3 fois en:
 - distribuant 0.4 mL de la Solution de Lavage dans chaque puits
 - aspirant le contenu de chaque puits
8. Pipeter 200 μ L de la Solution Chromogénique dans chaque puits dans les 15 minutes après la phase de lavage.
9. Incuber la microplaquette pendant 15 minutes à 18-25°C dans un agitateur horizontal mis à 700 rpm \pm 100 rpm, éviter exposition à la lumière du soleil.
10. Pipeter 100 μ L de la Solution d'arrêt dans chaque puits.
11. Lire les absorbances à 450 nm et 490 nm (filtre de référence 630 nm ou 650 nm) dans 3 heures et calculer les résultats comme décrits dans la section XI.

10 CALCUL DES RESULTATS

10.1 Lecture polychromatique:

1. En ce cas, le software fera le traitement des données.
2. La plaque est lue d'abord à 450 nm contre un filtre de référence mis à 650 nm (ou 630 nm).
3. Une seconde lecture est effectuée à 490 nm contre le même filtre de référence.
4. Le software manœuvrera le lecteur automatiquement et intégrera les deux lectures dans un modèle polychromatique. Cette technique peut générer des DO jusqu'à 10.
5. Le principe du traitement de données polychromatique est le suivant:
 - $X_i = DO \text{ à } 450 \text{ nm}$
 - $Y_i = DO \text{ à } 490 \text{ nm}$
 - Utilisant une régression linéaire non pondérée standard, les paramètres A & B sont calculés : $Y = A*X + B$
 - Si $X_i < 3$ unités DO, X calculé = X_i
 - Si $X_i > 3$ unités DO, X calculé = $(Y_i - B)/A$
 - Un lissage de courbes « 4 paramètres » est utilisé pour la courbe de calibration.
 - La concentration en IL-1 β des échantillons est déterminée par interpolation sur la courbe de calibration.

10.2 Lecture bichromatique

1. Lire la plaque à 450 nm contre un filtre de référence mis à 650 nm (ou 630 nm).
2. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
3. Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les DO (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en IL-1 β (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l'aide des points de calibration, en connectant les points avec des lignes droites.
4. Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.
5. L'analyse informatique des données simplifiera les calculs. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.

11 DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont fournies pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe d'étalonnage.

IL-1 β -ELISA		Unités DO modèle polychromatique
Calibrateur	0 pg/mL	0,013
	24 pg/mL	0,121
	89 pg/mL	0,336
	320 pg/mL	1,042
	574 pg/mL	1,693
	1166 pg/mL	2,704

12 PERFORMANCE ET LIMITES

12.1 Sensibilité

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne DO déterminée à la fixation zéro, était de 0,35 pg/ml.

12.2 Spécificité

On n'a pas constaté de réaction croisée significative en présence de 500 ng d'IL-1 α , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , TNF- β , IFN- β , IFN- γ , TGF- β , GM-CSF, OSM, MIP-1 α , MIP-1 β , LIF, MCP-1, G-CSF et RANTES. Ce dosage de l'IL-1 β est spécifique de l'IL-1 β humaine naturelle et recombinante.

12.3 Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	$<X> \pm SD$ (pg/mL)	CV (%)	Sérum	N	$<X> \pm SD$ (pg/mL)	CV (%)
A	10	127 \pm 3	2.3	A	20	120 \pm 6	4,9
B	10	733 \pm 11	1.4	B	20	549 \pm 14	2,5

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

12.4 Exactitude

TEST DE RECUPERATION

Echantillon	IL-1 β ajoutée (pg/ml)	IL-1 β récupérée (pg/ml)	Récupération (%)
Sérum	1282	1196	93
	605	542	90
	329	314	95
	157	131	84
	72	64	89
	31	28	92
Plasma	1282	1208	94
	605	573	95
	329	321	97
	157	146	93
	72	67	92
	31	29	94

TEST DE DILUTION

Echantillon	Dilution	Concent. théorique (pg/ml)	Concent. Mesurée (pg/ml)
Sérum	1/1	-	1197
	1/2	598	637
	1/4	299	320
	1/8	150	164
	1/16	75	86
	1/32	37	41
Plasma	1/1	-	688
	1/2	344	336
	1/4	172	172
	1/8	86	87
	1/16	43	51
	1/32	26	22
	1/64	13	9
	1/128	4	4

Les échantillons ont été dilués avec le Diluant du spécimen.

12.5 Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon

Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 30 minutes après que le calibrateur ait été ajouté aux puits.

DELAI				
	T0	10 min	20 min	30 min
1	1485	1575	1553	1647
2	1123	1129	1150	1228
4	592	572	595	606
5	375	391	375	375
6	1454	1429	1438	1605
500	641	583	645	658
1000	1107	1087	1158	1158
1500	1440	1261	1399	1425

12.6 Effet crochet

Un échantillon dopé avec de l'IL-1 β jusqu'à 1 μ g/ml donne des DO supérieurs au dernier point de calibration.

13 CONTROLE DE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés. Des contrôles qui contiennent de l'azoture influenceront la réaction enzymatique et ne peuvent pas être utilisés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en double des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.
- On recommande que les contrôles soient testés de façon routinière comme des échantillons inconnus pour mesurer la variabilité du test. La réalisation du test doit être suivie avec des fichiers de contrôle de qualité des contrôles.
- On recommande de vérifier visuellement le lissage de la courbe sélectionnée par l'ordinateur.

14 VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont données à titre d'information; chaque laboratoire doit établir ses propres fourchettes de valeurs normales.

A titre indicatif, la moyenne de 22 sérum normaux était de 5,4 pg/ml (SD = 3,9) et la fourchette des valeurs se situait entre 0 pg/ml et 13,6 pg/ml. Cette étude a été réalisée sur des échantillons provenant de personnes en bonne santé apparente, avec de faibles teneurs en CRP.

La moyenne de 103 plasma normaux, prélevés dans de strictes conditions de prélèvement, était de 2,6/ml (SD = 5,3) et la fourchette des valeurs se situait entre 0 pg/ml et 17 pg/ml (basée sur les percentiles de 2,5% & 97,5%).

15 PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devra être conforme aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

Eviter le contact de la peau avec tous les réactifs. La Solution d'arrêt contient de l'HCl. En cas de contact, laver avec beaucoup d'eau.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

16 BIBLIOGRAPHIE

1. OPPENHEIM J.J. and GERY I., (1982). Interleukin-1 is more than an interleukin. Immunology Today, 3:113-119.
2. MIZEL S.B., (1982). Interleukin-1 and T-cell activation. Immunol. Rev., 63:51-71.
3. DINARELLO C.A., (1984). Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute phase response. N. Eng. J. Med., 311:1413-1418.
4. DINARELLO C.A., (1985). An update on human interleukin-1 : from molecular biology to clinical relevance. J. Clin. Immunol., 5:287-297.
5. BAILLY, S. et al., (1994) Comparative production of IL-1 β and IL-1 α by LPS-stimulated human monocytes: ELISAs measurement revisited. Cytokine, 6:111-115.
6. DINARELLO C.A., (1988) Biology of interleukin-1. FASEB J., 2:108-115.

17 RESUME DU PROTOCOLE

	CALIBRATEURS (μ l)	ECHANTILLON(S) CONTROLES (μ l)
Calibrateurs (0-5)	200	-
Echantillons, Contrôles	-	200
Conjugué Anti-IL-1 β -HRP	50	50
Incuber pendant 2 heures à 18-25°C avec agitation continue à 700 rpm. Aspirer le contenu de chaque puits. Laver 3 fois avec 400 μ l de la Solution de Lavage et aspirer.		
Solution Chromogénique	200	200
Incuber pendant 15 min à 18-25°C avec agitation continue à 700 rpm.		
Solution d'arrêt	100	100
Lire sur un lecteur de microplaques et enregistrer l'absorbance de chaque puits à 450 nm (contre 630 ou 650 nm) et 490 nm (contre 630 ou 650 nm)		

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français	Português
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes	Conformidade Europeia
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation	Consultar as instruções de uso
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Diagnistica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Catalogue number *	Katalognummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence	Número de catálogo
	Batch code *	Chargen-bezeichnung *	Lotto no	Número de lote	No. de lot	Código do lote
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests	Suficiente para <n> determinações
	Temperature limit *	Temperaturgrenzwerte *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservacion	Temperature de conservation	Limites de temperatura
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation	Prazo de validade
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant	Fabricante
	Distributor *	Vertriebspartner *	Distributore	Distribuidor	Distributeur	Distribuidor
	Date of manufacture *	Herstellungsdatum *	Data di produzione	Fecha de fabricación	Date de production	Data de fabricação
	Biological risks *	Biologische Risiken *	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques	Riscos biológicos
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention	Cuidado
	Unique device Identifier *	eindeutige Produktidentifizierung *	Identificativo unico del dispositivo*	Identificación exclusiva del dispositivo *	Identifiant de dispositif unique*	Identificador único do dispositivo *
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches	
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement	Conteúdo
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité	Volume / Quantidade