Instructions for Use

IL 8 ELISA

IVD

CE

REF **EIA-4700**

Σ **96**

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 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

(231023)

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

Table of Contents / Tabella die Contenuti

1 INTENDED USE ... 2
2 CLINICAL BACKGROUND ... 2
3 PRINCIPLES OF THE METHOD ... 2
4 REAGENTS PROVIDED ... 2
5 SUPPLIES NOT PROVIDED ... 3
6 REAGENT PREPARATION ... 3
7 STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS ... 3
8 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION ... 3
9 PROCEDURE ... 4
10 CALCULATION OF RESULTS ... 4
11 TYPICAL DATA ... 5
12 PERFORMANCE AND LIMITATIONS ... 5
13 INTERNAL QUALITY CONTROL ... 6
14 REFERENCE INTERVALS ... 6
15 PRECAUTIONS AND WARNINGS ... 6
16 BIBLIOGRAPHY ... 7
17 SUMMARY OF THE PROTOCOL ... 7

1 USO DEL KIT ... 8
2 INFORMAZIONI CLINICHE ... 8
3 PRINCIPIO DEL METODO ... 8
4 REATTIVI FORNITI ... 9
5 REATTIVI NON FORNITI ... 9
6 PREPARAZIONE DEI REATTIVI ... 9
7 CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI ... 10
8 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI ... 10
9 METODO DEL DOSAGGIO ... 10
10 CALCOLO DEI RISULTATI ... 11
11 CARATTERISTICHE TIPICHE ... 12
12 CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO ... 12
13 CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO ... 13
14 INTERVALLI DI RIFERIMENTO ... 13
15 PRECAUZIONI PER L'USO ... 13
16 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI ... 14
17 SCHEMA DEL DOSAGGIO ... 14

SYMBOLS USED ... 15

1 INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the in vitro quantitative measurement of human interleukin-8 (IL-8) in plasma.

2 CLINICAL BACKGROUND

2.1 Biological activities

IL-8 (also known as NAP-1 for Neutrophil-activating peptide) is a chemoattractant protein for neutrophils. This cytokine belongs to a new family of chemotactic peptides called "chemokines". This proinflammatory mediator is secreted by different cells such as monocytes, neutrophils, endothelial cells, fibroblast after activation, and by mitogen-stimulated T lymphocytes. IL-8 is a key cytokine that has been found in scales of psoriasis patients, in synovial fluid of patients suffering from rheumatoid arthritis and gout. The role of IL-8 in the recruitment of neutrophils in the lung during ARDS has also been suggested.

2.2 Clinical application

The IL-8 level in the septic shock patients was found to correlate with mortality and in acute graft liver rejection the IL-8 serum levels were reported to have markedly increased. The level of IL-8 in these or other conditions may prove to be important in characterizing the progress of these disease conditions.

3 PRINCIPLES OF THE METHOD

The IL-8-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-8. 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-8 – 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-8 concentration.

A calibration curve is plotted and IL-8 concentration in samples is determined by interpolation from the calibration curve. The use of the ELISA reader (linearity up to 3 OD units) and a sophisticated data reduction method (polychromatic data reduction) result in a high sensitivity in the low range and in an extended calibration range.

4 REAGENTS PROVIDED

	Reagents	96 tests	Reconstitution
MICROTITER PLATE	Microtiterplate (96 breakable wells) anti IL-8 (monoclonal antibodies) coated wells	96 wells	**Ready** for use
Ab HRP	Conjugate: HRP labelled anti-IL-8 (monoclonal antibodies) in TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin and thymol	1 vial 6 mL	**Ready** for use
CAL N	Calibrator N = 0 to 5 (see exact values on vial labels) in human plasma with benzamidin and thymol	6 vials lyophil.	**Add** 1 mL distilled water
DIL SPE	Specimen Diluent: human plasma with benzamidin and thymol	2 vials lyophil.	**Add** distilled water (see on the label for the exact volume)
INC BUF	Incubation Buffer: Phosphate buffer with bovine serum albumin and thymol	1 vial 11 mL	**Ready** for use
WASH SOLN CONC	Wash Solution (Tris-HCl)	1 vial 10 mL	**Dilute** 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CONTROL N	Controls - N = 1 or 2 in human plasma with thymol	2 vials lyophil.	**Add** 1 mL distilled water
CHROM TMB	Chromogen TMB (Tetramethylbenzydine)	1 vial 12 mL	**Ready** for use
STOP SOLN	Stop Solution: HCl, 1N	1 vial 12 mL	**Ready** for use

Note: 1. Use Specimen Diluent for sample dilutions.

2. 1 pg of the calibrator preparation is equivalent to 1 mU of the NIBSC 1st IS 89/520.

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

A. **Calibrators**:
Reconstitute calibrators with 1 mL distilled water.

B. **Controls**:
Reconstitute the controls with 1 mL distilled water.

C. **Specimen Diluent**:
Reconstitute specimen diluent to the volume specified on the vial label with distilled water

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

7 STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the vial label, if kept at 2 °C to 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 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 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 to 8 °C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

8 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- 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-8 production by blood cells and thus falsely increase plasma IL-8 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 12.5 (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 100 µL of Incubation Buffer into all the wells
4. Pipette 100 µL of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
5. Pipette 50 µL of anti-IL-8-HRP conjugate into all the wells.
6. Incubate for 2 hours at 18 °C - 25 °C on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm.
7. Aspirate the liquid from each well.
8. Wash the plate 3 times by:
   Dispensing 0.4 mL of Wash Solution into each well
   Aspirating the content of each well
9. Pipette 100 µL of the Chromogenic Solution into each well within 15 minutes following the washing step.
10. Incubate the microtiter plate for 15 minutes at 18 °C - 25 °C on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm, avoid direct sunlight.
11. Pipette 100 µL of Stop solution into each well.
12. Read the absorbencies at 450 nm and 490 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 30 minutes 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:
   Xi = OD at 450 nm
   Yi = OD at 490 nm
   Using a standard unweighted linear regression, the parameters A & B are calculated: $Y = A \times X + B$

If Xi < 3 OD units, then X calculated = Xi

If Xi > 3 OD units, then X calculated = (Yi - B)/A

A 4-parameter logistic curve fitting is used to build up the calibration curve.

The IL-8 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-8 (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-8-ELISA		OD units Polychromatic
Calibrator	0 pg/mL	0.029
	40.4 pg/mL	0.120
	58 pg/mL	0.164
	156 pg/mL	0.423
	551 pg/mL	1.350
	1845 pg/mL	2.973

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 1,1 pg/mL.

12.2 Specificity

No significant cross-reaction was observed in presence of 50 ng of IL-1α, IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, TNF-α, TNF-β, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, TGF-β, GM-CSF, OSM, MIP-1α, MIP-1β, LIF, MCP-1, G-CSF, RANTES, PF-4, βTG, GRO, IP-10 and SCF.

This IL-8 assay is specific for human natural and recombinant IL-8 and is able to recognize the 72 a.a. form of IL-8.

12.3 Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (pg/mL)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (pg/mL)	CV (%)
A	12	102 ± 3	3.2	A	20	150 ± 13	8.6
B	12	227 ± 8	3.6	B	20	442 ± 58	13.1

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

12.4 Accuracy

RECOVERY TEST

Sample	Added IL-8 (pg/mL)	Recovered IL-8 (pg/mL)	Recovery (%)
Plasma	0	0	-
	61	65	105
	108	127	118
	292	349	119

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (pg/mL)	Measured Concent. (pg/mL)
Plasma	1/1	-	678
	1/2	339	272
	1/4	169	148
	1/8	85	82
	1/16	42	40

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	66	53	59	55	62
2	118	114	111	108	113
3	246	224	221	213	221
4	914	906	905	882	855

12.6 Hook effect

A sample spiked with IL-8 up to 0.5 µg/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 results of 36 EDTA plasma samples from apparently healthy persons with low CRP levels, ranged between 0 and 132 pg/mL. Among them, 34 samples obtained values below 50 pg/mL.

15 PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with all reagents, Stop Solution contains HCl. In case of contact, wash thoroughly with water.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

16 BIBLIOGRAPHY

1. MATSUHUMA K., et al. (1989).
Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocitic cell line.
J. Exp. Med., 169 : 1485-1490.
2. BAGGIOLINI M., et al. (1989).
Neutrophil-activating peptide-1/Interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils.
J. Clin. Invest., 84 : 1045-1049.
3. HACK C., et al. (1992).
Interleukin-8 in sepsis : relation to shock and inflammatory mediators.
Infect. Immun., 60 : 2835-2842.
4. TILG H., et al. (1992).
Interleukin-8 serum concentrations after liver transplantation.
Transplant, 53 : 800-803.

17 SUMMARY OF THE PROTOCOL

	CALIBRATORS (µL)	**SAMPLE(S) CONTROLS (µL)**
Incubation Buffer	100	100
Calibrators (0-5)	100	-
Samples, Controls	-	100
Anti-IL-8 -HRP conjugate	50	50
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.		
Chromogenic Solution	100	100
Incubate for 15 min at 18 °C - 25 °C with continuous shaking at 700 rpm.		
Stop Solution	100	100
Read on a microtiterplate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (and 490 nm) versus 630 (or 650 nm)		

1 USO DEL KIT

Kit immunoenzimetrico per la determinazione quantitativa in vitro dell'interleuchina-8 umana (IL-8) in plasma.

2 INFORMAZIONI CLINICHE

2.1 Attività biologiche

La IL-8, nota anche come NAP-1 (Peptide Attivante i Neutrofili), è una proteina chemioattraente per i neutrofili. Tale citochina appartiene ad una nuova famiglia di peptidi chemiotattici chiamati "chemochine". È un mediatore proinfiammatorio che viene secreto da differenti tipi di cellule quali monociti, neutrofili, cellule endoteliali, fibroblasti attivati e linfociti T fitogeno-stimolati. La IL-8 è una citochina chiave la cui presenza è stata rilevata nelle scaglie di pazienti affetti da psoriasi e nel fluido sinoviale di soggetti affetti da artrite reumatoide e gotta. È stato altresì suggerito un ruolo attivo della IL-8 nel reclutamento di neutrofili nel polmone di soggetti con ARDS.

2.2 Applicazione clinica

In pazienti con shock settico, i livelli di IL-8 sono risultati correlati alla mortalità, e in caso di rigetto acuto dopo trapianto di fegato sono stati evidenziati livelli di IL-8 marcatamente aumentati. La misurazione dei livelli di IL-8 nei casi succitati e in altre condizioni potrebbe dimostrare una sua validità nella valutazione della progressione della malattia.

3 PRINCIPIO DEL METODO

IL-8-ELISA è un immunosaggio a sensibilità amplificata a fase solida eseguito su piastre di microtitolazione. Il dosaggio utilizza anticorpi monoclonali (Mabs) diretti contro epitopi distinti dell'IL-8. I calibratori e i campioni reagiscono con la cattura dell'anticorpo monoclonale (MAb 1) che riveste il pozzetto di microtitolazione e con un anticorpo monoclonale (MAb 2) marcato con horseradish perossidasi (HRP). Dopo un periodo di incubazione che consenta la formazione di un sandwich: MAb 1 di rivestimento – IL-8 umana – MAb 2 – HRP, la piastra di microtitolazione viene lavata per rimuovere l'anticorpo marcato con enzima non legato. L'anticorpo marcato con enzima non legato viene misurato attraverso una reazione cromogenica. Si procede quindi con l'aggiunta della soluzione cromogena (TMB) e successiva incubazione. La reazione viene interrotta con l'aggiunta di Soluzione di arresto; quindi la piastra di microtitolazione viene letta alla lunghezza d'onda adeguata. La quantità di turnover del substrato viene determinata colorimetricamente misurando l'assorbanza che è proporzionale alla concentrazione di IL-8.

Viene tracciata una curva di calibrazione e la concentrazione IL-8 nei campioni viene determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione. L'utilizzo del lettore ELISA (linearità fino a 3 unità OD) associato all'impiego di un sofisticato metodo di riduzione dati (riduzione dati policromatica) garantisce un'elevata sensibilità nel range basso dei valori e un esteso range di calibrazione.

4 REATTIVI FORNITI

	Reattivi	Kit da 96 test	Volume di ricostituzione
MICROTITER PLATE	Micropiastra (96 pozzetti divisibili), pozzetti rivestiti anti IL-8 (anticorpi monoclonali)	96 pozzetti	**Pronto** per l'uso
Ab HRP	Coniugato: anti-IL-8 (anticorpi monoclonali) marcato con HRP in tampone TRIS-maleato con albumina di siero bovino e timolo.	1 flacone 6 mL	**Pronto** per l'uso
CAL N	Calibratore N= 0 - 5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in plasma umano con benzamidina e timolo.	6 flaconi liofiliz.	**Aggiungere** 1 mL di acqua distillata
DIL SPE	Diluente del Campione: plasma umano con benzamidina e timolo.	2 flacone liofiliz.	**Aggiungere** acqua distillata (vedi etichetta per volumi esatti)
INC BUF	Tampone di Incubazione: Tampone fosfato con albumina di siero bovino e timolo.	1 flacone 11 mL	**Pronto** per l'uso
WASH SOLN CONC	Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	1 flacone 10 mL	**Diluire** 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico).
CONTROL N	Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano con timolo	2 flaconi liofiliz.	**Aggiungere** 1 mL di acqua distillata
CHROM TMB	Soluzione Cromogena TMB (tetrametilbenzidina)	1 flacone 12 mL	**Pronto** per l'uso
STOP SOLN	Soluzione di arresto: HCl, 1N	1 flacone 12 mL	**Pronto** per l'uso

Note: 1. Usare Diluente del Campione per diluire i campioni.

2. 1 pg della preparazione standard è equivalente a 1 mU dell'NIBSC 1st IS 89/520.

5 REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

1. Acqua distillata di qualità elevata
2. Pipette per dispensare 50 µl, 100 µL 200 µL, 1 mL e 10 mL (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Agitatore tipo vortex.
4. Agitatore magnetico.
5. Agitatore orizzontale per micropiastre da 700 ± 100 rpm.
6. Lavatrice per piastra di microtitolazione
7. Lettore di micropiastre per letture a 450, 490 e 650 nm (in caso di lettura policromatica) o per letture a 450 e 650 nm (in caso di lettura bicromatica).

6 PREPARAZIONE DEI REATTIVI

A. Calibratore:
Ricostituire i calibratori con 1 mL di acqua distillata.

B. Controlli:
Ricostituire i controlli con 1 mL di acqua distillata.

C. **Diluente del Campione**:
Ricostituire il Diluente del Campione aggiungendo acqua distillata fino al volume riportato sull'etichetta del flacone.

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

7 CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2 °C - 8 °C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Le strisce reattive inutilizzate devono essere conservate a 2 °C - 8 °C, in un contenitore sigillato che contenga un essiccante fino alla data di scadenza.
- Dopo la ricostituzione, i calibratori, i controlli e il Diluente del Campione sono stabili 4 giorni a 2 °C - 8 °C. Per periodi di conservazione molto lunghi, preparare e mantenere le aliquote a -20°C per un massimo di 2 mesi. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento dei campioni.
- La soluzione di lavaggio concentrata è stabile a 18 °C - 25 °C fino alla data di scadenza.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il coniugato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2 °C - 8 °C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

8 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento dei campioni.
- Prima dell'impiego, tutti i campioni devono essere a 18 °C - 25 °C. Si raccomanda di vortexare i campioni prima di utilizzarli.
- Le condizioni di raccolta possono influenzare i valori. Adottare pertanto le massime precauzioni durante la raccolta per evitare che eventuali impurità contenute nei campioni possano stimolare la produzione di IL-8 da parte delle cellule ematiche con conseguente aumento falsato dei livelli sierici di IL-8.
- Le provette di raccolta devono essere apirogene. Il plasma può essere raccolto in provette sterili con EDTA e rapidamente separato dopo centrifugazione. L'utilizzo di provette contenenti eparina è sconsigliabile in considerazione della frequente contaminazione pirogenica dei lotti di eparina.

9 METODO DEL DOSAGGIO

9.1 Avvertenze generali

Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza.

Non mescolare reattivi di lotti diversi.

Prima dell'uso portare tutti i reattivi a 18 °C - 25 °C.

Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione.

Eseguire calibratori, controlli e campioni in doppio. Si raccomanda l'allineamento verticale.

Utilizzare un contenitore di plastica pulito per preparare la soluzione di lavaggio.

Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.

Per la distribuzione della Soluzione di Cromogena e la Soluzione di arresto evitare pipette con parti metalliche.

L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio.

Rispettare i tempi di incubazione.

Per evitare derive, l'intervallo tra il pipettaggio del primo calibratore e l'ultimo campione deve essere limitato ai tempi riportati nella sezione 12.5 (Tempo Trascorso).

Allestire una curva di calibrazione per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di calibrazione di sedute analitiche precedenti.

La Soluzione Cromogena deve essere incolore. L'eventuale sviluppo di un colore blu entro pochi minuti dalla preparazione indica che il reagente è inutilizzabile e deve essere eliminato.

Distribuzione della Soluzione Cromogena entro 15 minuti dopo il lavaggio della piastra di microtitolazione.

Durante l'incubazione con la Soluzione Cromogena evitare la luce diretta del sole sulla piastra di microtitolazione.

9.2 Metodo del dosaggio

1. Selezionare il numero di strisce reagenti necessario per il test. Le strisce reagenti inutilizzate devono essere risigillate nel contenitore con un essiccante e conservate a 2 °C - 8 °C.
2. Assicurare le strisce reagenti nel telaio di supporto.
3. Pipettare 100 µL di Tampone di Incubazione in ogni pozzetto
4. Pipettare 100 µL di ogni calibratore, controllo e campione nei pozzetti adeguati.
5. Pipettare 50 µL di coniugato anti-IL-8- HRP in tutti i pozzetti.
6. Incubare per 2 ore a 18 °C - 25 °C su agitatore orizzontale regolato a 700 ± 100 rpm.
7. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
8. Lavare la piastra 3 volte :
   versando 0,4 mL di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
   aspirando il contenuto di ogni pozzetto
9. Pipettare 100 µL della Soluzione Cromogena in ogni pozzetto entro 15 minuti dal termine della fase di lavaggio.
10. Incubare la piastra di microtitolazione per 15 minuti a 18 °C - 25 °C su un agitatore orizzontale a 700 ± 100 rpm; evitare la luce diretta del sole.
11. Pipettare 100 µL di soluzione di arresto in ogni pozzetto.
12. Leggere le assorbanze a 450 nm a 490 nm (filtro di riferimento a 630 nm o 650 nm) entro 30 minuti e calcolare i risultati come descritto nella sezione 10.

10 CALCOLO DEI RISULTATI

10.1 Lettura policromatica

1. In questo caso, l'elaborazione dati verrà effettuata dal software.
2. La piastra viene letta a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
3. Verrà quindi effettuata una seconda lettura a 490 nm rispetto allo stesso filtro di riferimento.
4. Il software guiderà automaticamente il lettore e integrerà le due letture utilizzando un modello policromatico. Tale tecnica può generare valori fino a 10 OD.
5. Il principio dell'elaborazione policromatica dei dati è la seguente:

   Xi = OD a 450 nm

   Yi = OD at 490 nm

   Utilizzando una regressione lineare standard non pesata, i parametri A & B sono calcolati: $Y = A \times X + B$

   Se Xi <3 unità OD, X calcolato = Xi

   Se Xi >3 unità OD, X calcolato = (Yi - B)／A

   Per tracciare la curva di calibrazione viene utilizzato un modello di adattamento della curva logistica a 4 parametri.

   La concentrazione di IL-8 nel campione viene determinata per interpolazione sulla curva di calibrazione.

10.2 Lettura bicromatica

1. Leggere la piastra a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
3. Costruire la curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica o lineare ponendo in ordinata le medie dei OD dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di IL-8, collegando i punti tracciati con linee rette.
4. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
5. E' possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

11 CARATTERISTICHE TIPICHE

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

IL-8-ELISA		Unità OD Modello policromatico
Calibratore	0 pg/mL	0,029
	40,4 pg/mL	0,120
	58 pg/mL	0,164
	156 pg/mL	0,423
	551 pg/mL	1,350
	1845 pg/mL	2,973

12 CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

12.1 Sensibilità

Venti replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard.

La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con OD pari alla media più 2 deviazioni standard di 20 replicati dello standard zero, è risultata essere 1,1 pg/mL.

12.2 Specificità

Nessuna reazione crociata significativa è stata osservata in presenza di 50 ng di IL-1α, IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, TNF-α, TNF-β, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, TGF-β, GM-CSF, OSM, MIP-1α, MIP-1β, LIF, MCP-1, G-CSF, RANTES, PF-4, βTG, GRO, IP-10 e SCF.

Tale test per il dosaggio della IL-8 è specifico per la IL-8 naturale e ricombinante umana ed è in grado di riconoscere la IL-8 di 72 aa.

12.3 Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> ± SD (pg/mL)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (pg/mL)	CV (%)
A	12	102 ± 3	3,2	A	20	150 ± 13	8,6
B	12	227 ± 8	3,6	B	20	442 ± 58	13,1

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

12.4 Accuratezza

TEST DI RECUPERO

Campione	IL-8 aggiunta (pg/mL)	IL-8 recuperata (pg/mL)	Recupero (%)
Plasma	0	0	-
	61	65	105
	108	127	118
	292	349	119

TEST DI DILUIZIONE

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (pg/mL)	Concentrazione misurata (pg/mL)
Plasma	1/1	-	678
	1/2	339	272
	1/4	169	148
	1/8	85	82
	1/16	42	40

I campioni sono stati diluiti con Diluente del Campione.

12.5 Tempo trascorso tra l'aggiunta dell'ultimo calibratore e il campione

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 30 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

campione	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min
1	66	53	59	55	62
2	118	114	111	108	113
3	246	224	221	213	221
4	914	906	905	882	855

12.6 Effetto hook

Un campione ha cui è stata aggiunta IL-8 fino a 0,5 µg/mL ha OD superiori a quello dello standard più concentrato.

13 CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. I controlli che contengono azide interferiscono con la reazione enzimatica e quindi non possono essere utilizzati.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.
- Si raccomanda di saggiare i controlli con regolarità come campioni sconosciuti per misurare la variabilità del saggio. La resa del saggio deve essere monitorata con tabelle di controllo qualità dei controlli.
- È buona pratica verificare visivamente il modello di curva selezionato dal computer.

14 INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori vengono dati solo come guida; ogni laboratorio deve stabilire i propri intervalli normali di valori.

Come riferimento, i valori di 36 campioni di plasma EDTA appartenenti a soggetti apparentemente sani con bassi livelli di PCR sono risultati compresi nel range 0 – 132 pg/mL. Di questi, 34 hanno prodotto valori inferiori a 50 pg/mL.

15 PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.

Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare qualsiasi contatto della cute con tutti i reagenti, la Soluzione di Arresto contiene HCl. In caso di contatto, lavare abbondamentemente con acqua.

Non fumare, bere, mangiare o applicare cosmetici nell'area di lavoro. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Utilizzare indumenti protettivi e guanti monouso.

16 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. MATSUHUMA K., et al. (1989).
   Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocitic cell line.
   J. Exp. Med., 169 : 1485-1490.
2. BAGGIOLINI M., et al. (1989).
   Neutrophil-activating peptide-1/Interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils.
   J. Clin. Invest., 84 : 1045-1049.
3. HACK C., et al. (1992).
   Interleukin-8 in sepsis : relation to shock and inflammatory mediators.
   Infect. Immun., 60 : 2835-2842.
4. TILG H., et al. (1992).
   Interleukin-8 serum concentrations after liver transplantation.
   Transplant, 53 : 800-803.

17 SCHEMA DEL DOSAGGIO

	CALIBRATORE (µL)	**CAMPIONI CONTROLLI (µL)**
Tampone di Incubazione Calibratore (0 - 5) Campioni, controlli Coniugato anti-IL-8-HRP	100 100 - 50	100 - 100 50
Incubare per 2 ore a 18 °C - 25 °C in agitazione continua a 700 rpm. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 400 µL di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Soluzione di Cromogena	100	100
Incubare per 15 minuti a 18 °C - 25 °C in agitazione continua a 700 rpm.		
Soluzione di arresto	100	100
Leggere su un lettore per piastra da microtitolazione e registrare l'assorbanza di ogni pozzetto a 450 nm (e 490 nm) rispetto a 630 (o 650 nm)		

SYMBOLS USED

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