

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



# Interleukin-8 human ELISA



**DE4700**



**96**



Demeditec Diagnostics GmbH  
Lise-Meitner-Strasse 2  
24145 Kiel – Germany  
[www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)

**CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS / TABLA DE CONTENIDO**

|   |    |
|---|----|
| 1. INTENDED USE.....  | 3  |
| 2. CLINICAL BACKGROUND.....   | 3  |
| 3. PRINCIPLES OF THE METHOD .....                                     | 3  |
| 4. REAGENTS PROVIDED.....   | 4  |
| 5. SUPPLIES NOT PROVIDED.....   | 4  |
| 6. REAGENT PREPARATION .....  | 4  |
| 7. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS.....                     | 5  |
| 8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION .....                          | 5  |
| 9. PROCEDURE.....   | 5  |
| 10. CALCULATION OF RESULTS.....                                       | 6  |
| 11. TYPICAL DATA.....   | 7  |
| 12. PERFORMANCE AND LIMITATIONS .....                                 | 7  |
| 13. INTERNAL QUALITY CONTROL.....                                     | 8  |
| 14. REFERENCE INTERVALS .....   | 8  |
| 15. PRECAUTIONS AND WARNINGS .....                                    | 8  |
| BIBLIOGRAPHY.....   | 9  |
| SUMMARY OF THE PROTOCOL.....  | 9  |
|   |    |
| 1. VERWENDUNGSZWECK.....  | 10 |
| 2. KLINISCHER HINTERGRUND .....                                       | 10 |
| 3. GRUNDSÄTZE DER METHODE .....                                       | 10 |
| 4. MITGELIEFERTE REAGENZIEN .....                                     | 11 |
| 5. NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL .....                                | 11 |
| 6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN.....                                   | 12 |
| 7. AUFBEWAHRUNG UND VERFALLDATUM DER HALTBARKEIT DER REAGENZIEN ..... | 12 |
| 8. PROBENSAMMLUNG UND-VORBEREITUNG.....                               | 12 |
| 9. DURCHFÜHRUNG.....  | 13 |
| 10. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE.....                                    | 14 |
| 11. TYPISCHE WERTE.....   | 14 |
| 12. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN .....                               | 15 |
| 13. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE.....                                   | 16 |
| 14. ZU ERWARTENDE BEREICHE.....                                       | 16 |
| 15. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN.....                            | 16 |
| LITERATUR.....  | 16 |
| ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS .....                                  | 17 |
|   |    |
| 1. INDICACIONES.....  | 18 |
| 2. ANTECEDENTES CLÍNICOS .....  | 18 |
| 3. PRINCIPIOS DEL MÉTODO.....   | 18 |
| 4. REACTIVOS PROPORCIONADOS.....                                      | 19 |
| 5. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS .....                                | 19 |
| 6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS .....                                 | 19 |
| 7. CONSERVACIÓN Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS.....            | 20 |
| 8. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....                        | 20 |
| 9. PROCEDIMIENTO .....  | 20 |
| 10. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS.....                                    | 21 |
| 11. DATOS TÍPICOS.....  | 22 |
| 12. EFICACIA Y LIMITACIONES .....                                     | 22 |
| 13. CONTROL DE CALIDAD INTERNO .....                                  | 23 |
| 14. INTERVALOS DE REFERENCIA .....                                    | 23 |
| 15. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS .....                                 | 23 |
| BIBLIOGRAFÍA.....   | 24 |
| RESUMEN DEL PROTOCOLO .....   | 24 |
|   |    |
| SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS .....                              | 24 |

## **1. INTENDED USE**

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

## **2. CLINICAL BACKGROUND**

### **A. 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.

### **B. 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 Demeditec Interleukin-8 human ELISA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on microtiterplate. 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 microtiterplate is washed to remove unbound enzyme labelled antibody. Bound enzyme-labelled antibody is measured through a chromogenic reaction. Chromogenic solution (TMB) is added and incubated. The reaction is stopped with the addition of Stop Solution and the microtiterplate is then read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is proportional to the IL-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 Kit        | Reconstitution   |
|---|---------------------|--|
| <b>SORB</b> <b>MT</b><br>Microtiterplate with 96 anti-IL-8 (monoclonal antibodies) coated breakable wells                                       | 12 x 8 wells        | <b>Ready for use</b>   |
| <b>ENZ</b> <b>CONJ</b><br>Conjugate: HRP labelled anti-IL-8 (monoclonal antibodies) in TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin and thymol | 1 vial<br>6 ml      | <b>Ready for use</b>   |
| <b>CAL</b> <b>0 - 5</b> <b>LYO</b><br>Calibrator 0 to 5 (see exact values on QC data sheet) in human plasma with benzamidin and thymol          | 6 vials<br>lyophil. | <b>Add 1 ml distilled water</b>  |
| <b>SAM</b> <b>DIL</b> <b>LYO</b><br>Specimen Diluent: human plasma with benzamidin and thymol   | 2 vials<br>lyophil. | <b>Add distilled water (see on the QC data sheet for the exact volume)</b> |
| <b>INC</b> <b>BUF</b><br>Incubation Buffer: Phosphate buffer with bovine serum albumin and thymol   | 1 vial<br>11 ml     | <b>Ready for use</b>   |
| <b>WASH</b> <b>SOLN</b> <b>200x</b><br>Wash Solution (Tris-HCl)   | 1 vial<br>10 ml     | <b>Dilute 200x with distilled water (use a magnetic stirrer).</b>          |
| <b>CONTROL</b> <b>1 &amp; 2</b> <b>LYO</b><br>Controls 1 and 2 in human plasma with thymol  | 2 vials<br>lyophil. | <b>Add 1 ml distilled water</b>  |
| <b>SUB</b> <b>TMB</b><br>Chromogen TMB (Tetramethylbenzidine)   | 1 vial<br>12 ml     | <b>Ready for use</b>   |
| <b>STOP</b> <b>SOLN</b><br>Stop Solution: HCl 1.0N  | 1 vial<br>12 ml     | <b>Ready for use</b>   |

- Note:**
1. Use Specimen Diluent for sample dilutions.
  2. 1 pg of the calibrator preparation is equivalent to 1 mU of the NIBSC 1<sup>st</sup> 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 QC data sheet with distilled water
- D. Working Wash solution:** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 199 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (200x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

## **7. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS**

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the vial label, if kept at 2 to 8°C.
- Unused strips must be stored, at 2-8°C, in a sealed bag containing a desiccant until expiration date.
- After reconstitution, calibrators, controls and Specimen Diluent are stable for 4 days at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 2 months. Avoid successive freeze thaw cycles.
- The concentrated Wash Solution is stable at 18-25°C until expiration date.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, the conjugate is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

## **8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION**

- Avoid subsequent freeze thaw cycles.
- Prior to use, all samples should be at 18-25°C. It is recommended to vortex the samples before use.
- Sampling conditions can affect values, therefore, strict precautions have to be taken during sampling to avoid impurities contained in sampling materials that would stimulate IL-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**

### **A. Handling notes**

- Do not use the kit or components beyond expiry date.
- Do not mix materials from different kit lots.
- Bring all the reagents to 18-25°C prior to use.
- Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
- Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
- Use a clean plastic container to prepare the Wash Solution.
- In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
- For the dispensing of the Chromogenic Solution and the Stop Solution avoid pipettes with metal parts.
- High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
- Respect the incubation times.
- To avoid drift, the time between pipetting of the first calibrator and the last sample must be limited to the time mentioned in section 12 paragraph E (Time delay).
- Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.
- 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 microtiterplate.
- During incubation with Chromogenic Solution, avoid direct sunlight on the microtiterplate.

**B. Procedure**

1. Select the required number of strips for the run. The unused strips should be resealed in the bag with a desiccant and stored at 2-8°C.
2. Secure the strips into the holding frame.
3. Pipette 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 18-25°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 microtiterplate for 15 minutes at 18-25°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****A. 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:
  - $X_i = \text{OD at 450 nm}$
  - $Y_i = \text{OD at 490 nm}$
  - 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-8 concentration in samples is determined by interpolation on the calibration curve.

**B. Bichromatic Reading**

1. Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
2. Calculate the mean of duplicate determinations.
3. On semi-logarithmic or linear graph paper plot the OD values (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of IL-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 model |
|------------|------------|------------------------------|
| 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

### A. Detection Limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations above the average OD at zero binding, was 1,1 pg/ml.

### B. Specificity

No significant cross-reaction was observed in presence of 50 ng of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF, OSM, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , LIF, MCP-1, G-CSF, RANTES, PF-4,  $\beta$ TG, 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.

### C. Precision

| INTRA ASSAY |    |                         |           | INTER ASSAY |    |                         |           |
|-------------|----|-------------------------|-----------|-------------|----|-------------------------|-----------|
| Serum       | N  | <X> $\pm$ SD<br>(pg/ml) | CV<br>(%) | Serum       | N  | <X> $\pm$ SD<br>(pg/ml) | CV<br>(%) |
| A           | 12 | 102 $\pm$ 3             | 3.2       | A           | 20 | 150 $\pm$ 13            | 8.6       |
| B           | 12 | 227 $\pm$ 8             | 3.6       | B           | 20 | 442 $\pm$ 58            | 13.1      |

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

### D. Accuracy

#### RECOVERY TEST

| Sample | Added IL-8<br>(pg/ml) | Recovered IL-8<br>(pg/ml) | Recovery<br>(%) |
|--------|-----------------------|---------------------------|-----------------|
| Plasma | 0                     | 0                         | -               |
|        | 61                    | 65                        | 105             |
|        | 108                   | 127                       | 118             |
|        | 292                   | 349                       | 119             |

#### DILUTION TEST

| Sample | Dilution | Theoretical Conc.<br>(pg/ml) | Measured Conc.<br>(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.

**E. Time delay between last calibrator and sample dispensing**

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the calibrators have been added to the coated wells.

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

**F. 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 QC data sheet, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Controls that contain azide will interfere with the enzymatic reaction and cannot be used.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises
- It is recommended that controls be routinely assayed as unknown samples to measure assay variability. The performance of the assay should be monitored with quality control charts of the controls.
- It is good practise to check visually the curve fit selected by the computer.

**14. REFERENCE INTERVALS**

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

For guidance, the results of 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.



**BIBLIOGRAPHY**

1. MATSUHUMA K., et al. (1989). **Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic 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.

**SUMMARY OF THE PROTOCOL**

|  | <b>CALIBRATORS</b><br>( $\mu$ l) | <b>SAMPLE(S) CONTROLS</b><br>( $\mu$ l) |
|--|----------------------------------|---|
| Incubation Buffer  | 100                              | 100                                     |
| Calibrators (0-5)  | 100                              | -                                       |
| Samples, Controls  | -                                | 100                                     |
| Anti-IL-8 -HRP conjugate   | 50                               | 50                                      |
| Incubate for 2 hours at 18-25°C with continuous shaking at 700 rpm.<br>Aspirate the contents of each well.<br>Wash 3 times with 400 $\mu$ l of Wash Solution and aspirate. |                                  |   |
| Chromogenic Solution   | 100                              | 100                                     |
| Incubate for 15 min at 18-25°C with continuous shaking at 700 rpm.   |                                  |   |
| Stop Solution  | 100                              | 100                                     |
| Read on a microtiterplate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (and 490 nm) versus 630 (or 650 nm)  |                                  |   |

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Enzymimmunoassay zur quantitativen In-vitro-Bestimmung von humanem Interleukin-8 (IL-8) in Plasma.

## 2. KLINISCHER HINTERGRUND

### A. Biologische Aktivität

IL-8 (auch als NAP-1 für ‚Neutrophile aktivierendes Peptid‘ bekannt) ist ein chemoattraktives Protein für Neutrophile. Dieses Zytokin gehört zu einer neuen Familie von chemoattraktiven Peptiden namens ‚Chemokine‘. Dieser Entzündungsmediator wird von verschiedenen Zellen wie Monozyten, Neutrophilen, Endothelzellen, Fibroblasten nach Aktivierung und von mitogen-stimulierten T-Lymphozyten abgesondert. IL-8 ist ein Schlüssezytokin, das in großem Umfang bei Psoriasis-Patienten, in der Gelenkflüssigkeit von Patienten, die an rheumatischer Arthritis und Gicht leiden, gefunden wurde. Ebenfalls wird vermutet, dass IL-8 bei der Rekrutierung von Neutrophilen in der Lunge bei akuter respiratorischer Insuffizienz eine Rolle spielt.

### B. KLINISCHE ANWENDUNG

Der IL-8-Spiegel bei Patienten mit septischem Schock korreliert offenbar mit der Sterblichkeit, und bei akuter Abstoßung von Lebertransplantaten wurde eine deutliche Erhöhung der IL-8-Serum-Spiegel berichtet. Der IL-8-Spiegel bei diesen und anderen Erkrankungen könnte sich als wichtig bei der Beschreibung des Fortschreitens dieser Krankheitssymptome herausstellen.

## 3. GRUNDSÄTZE DER METHODE

Der Demeditec Interleukin-8 human ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf Mikrotiterplatten durchgeführt wird. Der Assay nutzt monoklonale Antikörper (MAKs), die gegen verschiedene Epitope von IL-8 gerichtet sind. Kalibratoren und Proben reagieren mit dem monoklonalen Fängerantikörper (MAK 1), mit dem die Kavitäten 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: MAK-1-Beschichtung – humanes IL-8 – MAK 2 – MRP. Nicht gebundene enzymmarkierte Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Gebundene enzymmarkierte Antikörper werden durch eine Farbreaktion bestimmt. Chromogene Lösung (TMB) wird hinzugefügt und inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe einer Stopplösung angehalten, und die Mikrotiterplatte wird bei der geeigneten Wellenlänge gelesen. Die Menge an Substratumsatz wird kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die proportional zur IL-8-Konzentration ist.

Es wird eine Kalibrationskurve erstellt, und die IL-8-Konzentration der Proben wird durch Interpolation von der Kalibrationskurve bestimmt. Der Einsatz des ELISA-Lesegeräts (Linearität bis zu 3 OD-Einheiten) und einer durchdachten Datenreduktionsmethode (polychromatische Datenreduktion) ergibt eine hohe Sensibilität im unteren Bereich und in einem erweiterten Kalibrierbereich.

**4. MITGELIEFERTE REAGENZIEN**

| Reagenzien  | 96 tests Kit                     | Rekonstitution  |
|---|----------------------------------|---|
| <b>SORB</b> <b>MT</b><br>Mikrotiterplatte (96 abbrechbare Kavitäten) mit anti-IL-8-beschichteten Kavitäten (monoklonale Antikörper)               | 96 Kavitäten                     | <b>Gebrauchsfertig</b>  |
| <b>ENZ</b> <b>CONJ</b><br>Konjugat: MRP-markierte Anti-IL-8 (monoklonale Antikörper) in TRIS-Maleat-Puffer mit Rinderserumalbumin und Thymol      | 1<br>Fläschchen<br>6 ml          | <b>Gebrauchsfertig</b>  |
| <b>CAL</b> <b>0 - 5</b> <b>LYO</b><br>Kalibrator 0 bis 5<br>(für genaue Werte QC Datenblatt beachten) in humanem Plasma mit Benzamidin und Thymol | 6<br>Fläschchen<br>lyophilisiert | 1 ml destilliertes Wasser <b>hinzufügen</b>   |
| <b>SAM</b> <b>DIL</b> <b>LYO</b><br>Probenverdünnungsmittel: humanes Plasma mit Benzamidin und Thymol   | 2<br>Fläschchen<br>lyophilisiert | Destilliertes Wasser <b>hinzufügen</b><br>(für das genaue Volumen QC Datenblatt beachten) |
| <b>INC</b> <b>BUF</b><br>Inkubationspuffer: Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin und Thymol  | 1<br>Fläschchen<br>11 ml         | <b>Gebrauchsfertig</b>  |
| <b>WASH</b> <b>SOLN</b> <b>200x</b><br>Waschlösung (Tris-HCl)   | 1<br>Fläschchen<br>10 ml         | 200 x mit destilliertem Wasser <b>verdünnen</b> (Magnetrührer verwenden).                 |
| <b>CONTROL</b> <b>1 &amp; 2</b> <b>LYO</b><br>Kontrollen 1 oder 2 in humanem Plasma mit Thymol  | 2<br>Fläschchen<br>lyophilisiert | 1 ml destilliertes Wasser <b>hinzufügen</b>   |
| <b>SUB</b> <b>TMB</b><br>Chromogenes TMB (Tetramethylbenzidin)  | 1<br>Fläschchen<br>12 ml         | <b>Gebrauchsfertig</b>  |
| <b>STOP</b> <b>SOLN</b><br>Stopplösung: HCl 1.0 N   | 1<br>Fläschchen<br>12 ml         | <b>Gebrauchsfertig</b>  |

**Anmerkung:**

1. Benutzen Sie das Probenverdünnungsmittel zur Probenverdünnung.
2. 1 pg der Kalibratorzubereitung entspricht 1 mU des NIBSC 1. IS 89/520.

**5. NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL**

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

1. Hochwertiges destilliertes Wasser
2. Pipetten für: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml und 10 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen aus Kunststoff wird empfohlen)
3. Vortexmischer
4. Magnetrührer
5. Horizontaler Mikrotiterplatten-Schüttler, Leistung 700 U/min ± 100 U/min
6. Waschgerät für Mikrotiterplatten
7. Mikrotiterplatten-Lesegerät zur Auswertung bei 450 nm, 490 nm und 650 nm (bei polychromatischer Auswertung) oder Auswertungsmöglichkeit bei 450 nm und 650 nm (bei bichromatischer Auswertung)

## 6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. **Kalibratoren:** Die Kalibratoren mit 1 ml destilliertem Wasser rekonstituieren.
- B. **Kontrollen:** Die Kontrollen mit 1 ml destilliertem Wasser rekonstituieren.
- C. **Probenverdünnungsmittel:** Das Probenverdünnungsmittel bis auf das auf dem QC-Datenblatt angegebene Volumen mit destilliertem Wasser rekonstituieren.
- D. **Arbeitswaschlösung:** Ein angemessenes Volumen an Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (200 x) mit 199 Anteilen destilliertem Wasser herstellen. Mit einem Magnetrührer homogenisieren. Nicht verwendete Arbeitswaschlösung nach jedem Arbeitstag entsorgen.

## 7. AUFBEWAHRUNG UND VERFALLDATUM DER HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder Rekonstituieren sind alle Kitkomponenten bei 2 bis 8 °C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Nicht verwendete Streifen müssen bis zum Verfallsdatum in einem Folienbeutel dicht verschlossen mit Trocknungsmittel bei 2° bis 8 °C gelagert werden.
- Nach ihrer Rekonstitution sind Kalibratoren, Kontrollen und Probenverdünnungsmittel vier Tage bei 2 bis 8 °C haltbar. Für längere Lagerungszeiten sind sie zu aliquotieren und bei -20 °C maximal zwei Monat aufzubewahren. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.
- Die konzentrierte Waschlösung ist bei 18 bis 25 °C bis zum Verfallsdatum haltbar.
- Die frisch hergestellte Arbeitswaschlösung sollte am selben Tag aufgebraucht werden.
- Nach der ersten Benutzung ist das Konjugat bei Lagerung im dicht verschlossenen Original-Fläschchen und bei 2 bis 8 °C bis zum Verfallsdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können auf Instabilität bzw. Zerfall hindeuten.

## 8. PROBENSAMMLUNG UND-VORBEREITUNG

- Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.
- Vor Gebrauch sollten alle Proben 18 bis 25 °C erreichen. Vortexmischen der Proben wird vor Gebrauch empfohlen.
- Die Bedingungen der Probennahme können die Werte beeinflussen. Daher müssen strikte Vorichtsmaßnahmen während der Probennahme getroffen werden, um Unreinheiten im Probenmaterial zu vermeiden, die die Produktion von IL-8 durch Blutzellen stimulieren und so fälschlicherweise die IL-8-Werte im Plasma erhöhen würden.
- Probenröhrchen müssen pyrogenfrei sein. Plasma kann auf steriler EDTA gesammelt und nach der Zentrifugierung rasch getrennt werden. Vom Gebrauch von Heparinröhrchen wird abgeraten, da Heparin-Batches oft mit Pyrogen kontaminiert sind.

## 9. DURCHFÜHRUNG

### A. Hinweise zur Handhabung

- Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Verfallsdatum.
- Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht.
- Bringen Sie alle Reagenzien vor Gebrauch auf 18 bis 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 Herstellung der Waschlösung einen sauberen Kunststoffbehälter.
- Verwenden Sie zur Zugabe jedes Reagenzes und jeder Probe saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Verwenden Sie zur Pipettierung der chromogenen Lösung und der Stopplösung keine Pipetten mit Metallteilen.
- Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.
- Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.
- Zur Vermeidung von Drift muss die Zeit zwischen dem Pipettieren des ersten Kalibrators und der letzten Probe auf die Zeit beschränkt werden, die in Abschnitt XIII Absatz E (Zeitverzögerung) erwähnt wird.
- Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve. Verwenden Sie keine Daten von früheren Durchläufen.
- Die chromogene Lösung sollte farblos sein. Verfärbt sie sich innerhalb weniger Minuten nach der Herstellung blau, bedeutet dies, dass das Reagenz unbrauchbar ist und entsorgt werden muss.
- Pipettieren Sie die chromogene Lösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte.
- Während der Inkubation mit der chromogenen Lösung ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

### B. VERFAHREN

1. Wählen Sie die erforderliche Anzahl von Streifen für den Durchgang. Die nicht verwendeten Streifen sollten wieder fest im Beutel verschlossen mit einem Trocknungsmittel und bei 2 bis 8 °C gelagert werden.
2. Die Streifen im Halterahmen befestigen.
3. 100 µl Inkubationspuffer in alle Kavitäten pipettieren.
4. Jeweils 100 µl Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
5. 50 µl Anti-IL-8-MRP Konjugat in alle Kavitäten pipettieren.
6. Zwei Stunden bei 18 bis 25 °C auf einem horizontalen Schüttler bei 700 U/min ± 100 U/min inkubieren.
7. Flüssigkeit aus jeder Kavität absaugen.
8. Platte drei Mal wie folgt waschen:
  - 0,4 ml Waschlösung in jede Kavität geben
  - Inhalt aus jeder Kavität absaugen
9. Binnen 15 Minuten nach dem Waschschrift 100 µl der chromogenen Lösung in jede Kavität pipettieren.
10. Die Mikrotiterplatte 15 Minuten bei 18 bis 25 °C auf einem Schüttler mit 700 U/min ± 100 U/min inkubieren. Direktes Sonnenlicht vermeiden.
11. 100 µl Stopplösung in jede Kavität pipettieren.
12. Absorptionen bei 450 nm und 490 nm (Referenzfilter 630 nm oder 650 nm) binnen 30 Minuten ablesen und Ergebnisse wie in Abschnitt 10 beschrieben berechnen.

**10. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE****A. Polychromatische Auswertung:**

1. In diesem Fall übernimmt die Software die Datenverarbeitung.
2. Platte zuerst bei 450 nm unter Vergleich mit einem Referenzfilter von 650 nm (oder 630 nm) ablesen.
3. Bei 490 nm wird zweite Ablesung unter Vergleich mit demselben Referenzfilter durchführen.
4. Die Software steuert das Lesegerät automatisch und integriert beide Ablesungen in ein polychromatisches Modell. Mit dieser Technik können ODs bis 10 generiert werden.
5. Das Prinzip der polychromatischen Datenverarbeitung sieht folgendermaßen aus:
  - $X_i = \text{OD bei 450 nm}$
  - $X_i = \text{OD bei 490 nm}$
  - Mithilfe einer standardisierten, ungewichteten linearen Regression werden die Parameter A und B berechnet:  $Y = A * X + B$
  - Wenn  $X_i < 3 \text{ OD-Einheiten}$ , dann  $X \text{ berechnet} = X_i$
  - Wenn  $X_i > 3 \text{ OD-Einheiten}$ , dann  $X \text{ berechnet} = (Y_i - B) / A$
  - Eine Vier-Parameter-Logistikkurven-Angleichung wird verwendet, um die Kalibrationskurve zu erstellen.
  - Die IL-8-Konzentration der Proben wird durch Interpolation von der Kalibrationskurve bestimmt.

**A. Bichromatische Auswertung:**

1. Platte bei 450 nm unter Vergleich mit einem Referenzfilter von 650 nm (oder 630 nm) ablesen.
2. Den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen berechnen.
3. Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier die OD-Werte (Ordinate) für jeden Kalibrator gegen die entsprechende Konzentration von IL-8 (Abszisse) ein und zeichnen Sie eine Kalibrationskurve durch die Kalibrationspunkte, indem Sie die eingetragenen Punkte durch gerade Linien verbinden.
4. Lesen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation auf der Kalibrationskurve ab.
5. Computergestützte Datenreduktion kann diese Berechnungen vereinfachen. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer Vier-Parameter-Kurvenfunktion.

**11. TYPISCHE WERTE**

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

| IL-8-ELISA |            | OD-Einheiten<br>Polychromatisches Modell |
|------------|------------|--|
| Kalibrator | 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. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN****A. Nachweisgrenze**

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen. Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem OD-Durchschnitt bei Nullbindung, entsprach 1,1 pg/ml.

**B. Spezifität**

Es wurde keine signifikante Kreuzreaktion bei Vorhandensein von 50 ng IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL 2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, TNF  $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF, OSM, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , LIF, MCP-1, G CSF, RANTES, PF-4,  $\beta$ TG, GRO, IP-10 und SCF beobachtet. Dieser IL-8-Assay ist spezifisch für humanes natürliches und rekombinantes IL-8 und kann die 72 Antikörper-Form von IL-8 erkennen.

**C. Präzision**

| INTRA ASSAY |    |                      |        | INTER ASSAY |    |                      |        |
|-------------|----|----------------------|--------|-------------|----|----------------------|--------|
| Serum       | N  | <X> $\pm$ SD (pg/ml) | CV (%) | Serum       | N  | <X> $\pm$ SD (pg/ml) | CV (%) |
| A           | 12 | 102 $\pm$ 3          | 3.2    | A           | 20 | 150 $\pm$ 13         | 8.6    |
| B           | 12 | 227 $\pm$ 8          | 3.6    | B           | 20 | 442 $\pm$ 58         | 13.1   |

SD: Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

**D. Genauigkeit****WIEDERFINDUNGSTEST**

| Probe  | Zugegebenes IL-8 (pg/ml) | Zurückgewonnenes IL-8 (pg/ml) | Rückgewinnung (%) |
|--------|--------------------------|-------------------------------|-------------------|
| Plasma | 0                        | 0                             | -                 |
|        | 61                       | 65                            | 105               |
|        | 108                      | 127                           | 118               |
|        | 292                      | 349                           | 119               |

**VERDÜNNUNGSTEST**

| Probe  | Verdünnung | Theoretische Konzentration (pg/ml) | Gemessene Konzentration (pg/ml) |
|--------|------------|------------------------------------|---------------------------------|
| Plasma | 1/1        | -                                  | 678                             |
|        | 1/2        | 339                                | 272                             |
|        | 1/4        | 169                                | 148                             |
|        | 1/8        | 85                                 | 82                              |
|        | 1/16       | 42                                 | 40                              |

Die Proben wurden mit Probenverdünnungsmittel verdünnt.

**E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator und Probenzugabe**

Wie im Folgenden gezeigt, bleibt die Genauigkeit der Assays selbst dann gewährleistet, wenn die Probe 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Kavitäten zugegeben wird.

**ZEITVERZÖGERUNG**

| Probe | 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    |

**F. Hook Effekt**

Eine Probe mit IL-8 bis zu 0,5  $\mu$ g/ml liefert höhere OD-Werte als der letzte Kalibratormesswert.

### 13. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Werte bei Kontrolle 1 und/oder Kontrolle 2 nicht dem auf dem QC-Datenblatt angegebenen Bereich, können die Ergebnisse ohne hinreichende Erklärung der Abweichungen nicht verwendet werden.
- Falls gewünscht, kann jedes Labor seine eigenen Pools mit Kontrollproben herstellen, die aliquotiert eingefroren werden sollten. Azid enthaltende Kontrollen 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 sollte mit den Qualitätskontrollkarten der Kontrollen überprüft werden.
- Es gilt als gute Praxis, visuell die vom Computer gewählte Kurvenanpassung zu prüfen.

### 14. ZU ERWARTENDE BEREICHE

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

Als Anhaltspunkt: Die Ergebnisse von 36 ETDA-Plasmaproben von augenscheinlich gesunden Personen mit niedrigen CRP-Spiegeln lagen zwischen 0 und 132 pg/ml. Die Werte von 34 dieser Proben lagen unter 50 pg/ml.

### 15. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

#### Sicherheit

Nur zur In-vitro-Diagnostik.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und/oder in 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 liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den lokalen 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 potentiell ansteckend behandelt werden. Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien, die Stopplösung enthält HCl. Bei Kontakt gründlich mit Wasser waschen.

Bitte im Arbeitsbereich nicht rauchen, trinken, essen oder Kosmetika anwenden. Nicht mit dem Mund pipettieren. Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe tragen.

#### LITERATUR

1. MATSUHUMA K., et al. (1989). **Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic 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.



**ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS**

|  | <b>KALIBRATOREN<br/>(<math>\mu</math>l)</b> | <b>PROBE(N)<br/>KONTROLLE (N)<br/>(<math>\mu</math>l)</b> |
|--|---|---|
| Inkubationspuffer  | 100   | 100   |
| Kalibratoren (0–5)   | 100   | -   |
| Proben, Kontrollen   | -   | 100   |
| Anti-IL-8-MRP Konjugat   | 50  | 50  |
| Zwei Stunden bei 18 bis 25 °C unter ständigem Schütteln bei 700 U/min inkubieren.<br>Inhalt aus jeder Kavität absaugen.<br>3 Mal mit 400 $\mu$ l Waschlösung waschen und absaugen. |   |   |
| Chromogene Lösung  | 100   | 100   |
| 15 Minuten bei 18 bis 25 °C unter ständigem Schütteln bei 700 U/min inkubieren.  |   |   |
| Stopplösung  | 100   | 100   |
| Auf einem Mikrotiterplatten-Lesegerät auswerten und die Absorption jeder Kavität bei 450 nm (und 490 nm) gegenüber 630 nm (oder 650 nm) verzeichnen.                               |   |   |

## 1. INDICACIONES

Ensayo inmunoenzimático para la determinación cuantitativa in vitro de interleucina-8 (IL-8) en plasma.

## 2. ANTECEDENTES CLÍNICOS

### A. Actividades biológicas

La IL-8 (también conocida como NAP-1, péptido activador de neutrófilos) es una proteína quimioatrayente de neutrófilos. Esta citocina pertenece a una nueva familia de péptidos quimiotácticos llamados quimiocinas. Este mediador proinflamatorio es secretado por diferentes células como monocitos, neutrófilos, células endoteliales, fibroblastos tras la activación y por linfocitos T estimulados con mitógenos. La IL-8 es una citocina clave que se ha encontrado en las escamas de los pacientes de psoriasis y en el líquido sinovial de pacientes que sufren artritis reumatoide y gota. También se ha sugerido que la IL-8 participa en el reclutamiento de neutrófilos en el pulmón durante el SDRA.

### B. Aplicación clínica

Se halló que el nivel de IL-8 de los pacientes con shock séptico se correlacionaba con la mortalidad, y en el rechazo agudo de injerto hepático, se observó que los niveles de IL-8 en suero aumentaron significativamente. El nivel de IL-8 en estas y otras afecciones podría ser importante para caracterizar el progreso de estas enfermedades.

## 3. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El Demeditec Interleukin-8 human ELISA es un inmunoensayo enzimático de sensibilidad amplificada en fase sólida que se realiza en placa de microvaloración. El ensayo utiliza anticuerpos monoclonales (AcM) dirigidos contra distintos epítopos de la IL-8. Los calibradores y las muestras reaccionan con el anticuerpo monoclonal de captura (AcM 1) que recubre el pocillo de microvaloración y con un anticuerpo monoclonal (AcM 2) marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Tras un período de incubación que permite la formación de un sándwich: AcM 1 recubierto – IL-8 humana – AcM 2 – HRP, se lava la placa de microvaloración para eliminar el anticuerpo marcado con enzimas no unidas. El anticuerpo marcado con enzimas unidas se mide a través de una reacción cromogénica. Se añade la solución cromogénica (TMB) y se incuba. Se detiene la reacción añadiendo solución de parada y a continuación se lee la placa de microvaloración a la longitud de onda adecuada. La cantidad de sustrato transformado se determina colorimétricamente midiendo la absorbancia, que es proporcional a la concentración de IL-8. Se representa una curva de calibración y se determina la concentración de IL-8 de las muestras mediante interpolación en la curva de calibración. El uso del lector ELISA (linealidad de hasta 3 unidades de DO) y de un método sofisticado de reducción de datos (reducción de datos policromáticos) da lugar a una sensibilidad alta en el intervalo bajo y a un intervalo de calibración extendido.

#### 4. REACTIVOS PROPORCIONADOS

| Reactivos  | Kit de 96 pruebas | Reconstitución   |
|--|-------------------|--|
| <b>SORB</b> <b>MT</b><br>Placa de microtitulación (96 pocillos rompibles) pocillos recubiertos con anti IL-8 (anticuerpos monoclonales)                  | 96 pocillos       | <b>Listo para usar</b>   |
| <b>ENZ</b> <b>CONJ</b><br>Conjugado: PHR marcado anti IL-8 (anticuerpos monoclonales) en tampón de maleato-TRIS con albúmina de suero bovino y timol     | 1 vial 6 ml       | <b>Listo para usar</b>   |
| <b>CAL</b> <b>0 - 5</b> <b>LYO</b><br>Calibrador N = 0 a 5 (véanse los valores exactos en la etiqueta del vial) en plasma humano con benzamidina y timol | 6 viales liofil.  | <b>Añadir 1 ml de agua destilada</b>                                 |
| <b>SAM</b> <b>DIL</b> <b>LYO</b><br>Diluyente de muestras: plasma humano con benzamidina y timol   | 2 viales liofil.  | Añadir agua destilada (véase en la etiqueta el volumen exacto)       |
| <b>INC</b> <b>BUF</b><br>Tampón de incubación: Tampón fosfato con albúmina de suero bovino y timol   | 1 vial 11 ml      | <b>Listo para usar</b>   |
| <b>WASH</b> <b>SOLN</b> <b>200x</b><br>Solución de lavado (Tris-HCl)   | 1 vial 10 ml      | <b>Diluir 200 x con agua destilada (usar un agitador magnético).</b> |
| <b>CONTROL</b> <b>1 &amp; 2</b> <b>LYO</b><br>Controles - N = 1 o 2 en plasma humano con timol   | 2 viales liofil.  | <b>Añadir 1 ml de agua destilada</b>                                 |
| <b>SUB</b> <b>TMB</b><br>TMB cromogénica (tetrametilbencidina)   | 1 vial 12 ml      | <b>Listo para usar</b>   |
| <b>STOP</b> <b>SOLN</b><br>Solución de parada: HCl 1,0N  | 1 vial 12 ml      | <b>Listo para usar</b>   |

- Nota:**
- Usar el diluyente de muestras para las diluciones.
  - 1 pg de la preparación del calibrador es equivalente a 1 mU del 1er estándar internacional 89/520 del NIBSC.

#### 5. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

El material siguiente es necesario pero no se proporciona en el kit:

- Agua destilada de alta calidad
- Pipetas para dispensación de: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml y 10 ml (se recomienda usar pipetas de precisión con puntas de plástico desechables)
- Agitador vórtex
- Agitador magnético
- Agitador de placas de microvaloración con capacidad de 700 rpm ± 100 rpm
- Lavador de placas de microvaloración
- Lector de placas de microvaloración con capacidad para leer a 450, 490 y 650 nm (en el caso de lectura policromática) o con capacidad para 450 y 650 nm (lectura bicromática)

#### 6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- Calibradores:** reconstituya los calibradores con 1 ml de agua destilada.
- Controles:** reconstituya los controles con 1 ml de agua destilada.
- Diluyente de muestras:** reconstituya el diluyente de muestras al volumen especificado en la etiqueta del vial con agua destilada.
- Solución de lavado de trabajo:** prepare un volumen adecuado de solución de lavado de trabajo añadiendo 199 volúmenes de agua destilada a 1 volumen de solución de lavado (200 x). Use un agitador magnético para homogeneizar. Deseche la solución de lavado de trabajo no utilizada al final de la jornada.

## 7. CONSERVACIÓN Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir o de la reconstitución, todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad, indicada en la etiqueta del vial, si se conservan entre 2 y 8 °C.
- Las tiras sin usar deben conservarse entre 2 y 8 °C en una bolsa sellada que contenga desecante hasta la fecha de caducidad.
- Tras la reconstitución, los calibradores, los controles y el diluyente de muestras se mantienen estables durante 4 días a 2-8 °C. Para períodos de tiempo más largos, deben tomarse partes alícuotas y conservarse a 20 °C durante un máximo de 2 meses. Evite ciclos posteriores de congelación y descongelación.
- La solución de lavado concentrada es estable a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada deberá utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el conjugado se mantiene estable hasta la fecha de caducidad si se conserva en el vial original bien cerrado entre 2 y 8 °C.
- Las alteraciones del aspecto físico de los reactivos del kit pueden indicar inestabilidad o deterioro.

## 8. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- Evite ciclos posteriores de congelación y descongelación.
- Antes de su uso, todas las muestras de estar a 18-25 °C. Se recomienda agitar las muestras en un vórtex antes de su uso.
- Las condiciones de obtención de las muestras pueden influir en los valores; por tanto, deben tomarse estrictas precauciones durante su recogida para evitar impurezas contenidas en los materiales de obtención de las muestras que estimulen la producción de IL-8 por las células sanguíneas y aumentar así incorrectamente los valores de IL-8 en plasma.
- Los tubos de recogida deben ser apirógenos. El plasma se puede recoger en EDTA estéril y separarlo rápidamente tras la centrifugación. Se desaconseja el uso de tubos de heparina, ya que con frecuencia los lotes de heparina están contaminados con pirógenos.

## 9. PROCEDIMIENTO

### A. Notas sobre la manipulación

- No utilice el kit o sus componentes pasada la fecha de caducidad.
- No mezcle materiales de distintos lotes de kit.
- Todos los reactivos deben estar a 18-25 °C antes de usarse.
- Mezcle bien todos los reactivos y muestras agitándolos o revolviéndolos suavemente.
- Realice los calibradores, los controles y las muestras por duplicado. Se recomienda alinear verticalmente.
- Utilice un recipiente de plástico limpio para preparar la solución de lavado.
- Para evitar la contaminación cruzada, utilice una punta de pipeta desechable al añadir cada reactivo y muestra.
- No utilice pipetas con partes metálicas para dispensar la solución cromogénica y la solución de parada.
- Las pipetas de alta precisión o un equipo de pipeteo automatizado mejorarán la precisión.
- Respete los tiempos de incubación.
- Para que no haya desvíos, el tiempo entre el pipeteo del primer calibrador y la última muestra debe limitarse al tiempo indicado en el apartado XIII, párrafo E (Tiempo de demora).
- Prepare una curva de calibración para cada análisis, no utilice datos de análisis anteriores.
- La solución cromogénica debe ser incolora. Si unos minutos después de la preparación se vuelve azul, indica que el reactivo no se puede usar y se debe desechar.
- Dispense la solución cromogénica antes de transcurridos 15 minutos desde el lavado de la placa de microvaloración.
- Durante la incubación con solución cromogénica, evite la luz solar directa en la placa de microvaloración.

**B. Procedimiento**

1. Seleccione el número necesario de tiras para el análisis. Las tiras no utilizadas deberían volverse a guardar herméticamente en la bolsa con un desecante y conservarse entre 2 y 8 °C.
2. Fije las tiras en el marco de soporte.
3. Pipetee 100 µl de tampón de incubación en todos los pocillos.
4. Pipetee 100 µl de cada calibrador, control y muestra en los pocillos adecuados.
5. Pipetee 50 µl del conjugado anti IL-8-HRP en todos los pocillos.
6. Incube durante 2 horas a 18-25 °C en un agitador horizontal configurado a 700 ± 100 rpm.
7. aspire el líquido de cada pocillo.
8. Lave la placa 3 veces:
  - Dispensando 0,4 ml de solución de lavado en cada pocillo
  - Aspirando el contenido de cada pocillo
9. Pipetee 100 µl de la solución cromogénica en cada pocillo en los 15 minutos siguientes al paso de lavado.
10. Incube la placa de microvaloración durante 15 minutos a 18-25 °C en un agitador horizontal configurado a 700 ± 100 rpm y evite la luz solar directa.
11. Pipetee 100 µl de solución de parada en cada pocillo.
12. Lea las absorbancias a 450 y 490 nm (filtro de referencia a 630 o 650 nm) antes de 30 minutos y calcule los resultados conforme se describe en el apartado XI.

**10. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS****A. Lectura policromática**

1. En este caso, el software realizará el procesamiento de los datos.
2. La placa se lee primero a 450 nm con respecto a un filtro de referencia configurado a 650 nm (o 630 nm).
3. Se realiza una segunda lectura a 490 nm con respecto al mismo filtro de referencia.
4. El software controlará el lector automáticamente e integrará ambas lecturas en un modelo policromático. Esta técnica puede generar densidades ópticas (DO) de hasta 10.
5. El principio del procesamiento de datos policromáticos es el siguiente:
  - $X_i = DO$  a 450 nm
  - $Y_i = DO$  a 490 nm
  - Utilizando una regresión lineal no ponderada estándar, se calculan los parámetros A y B:  
 $Y = A \cdot X + B$
  - Si  $X_i < 3$  unidades de DO, entonces la X calculada =  $X_i$
  - Si  $X_i > 3$  unidades de DO, entonces la X calculada =  $(Y_i - B)/A$
  - Se emplea un ajuste de la curva logística de 4 parámetros para generar la curva de calibración.
  - La concentración de IL-8 de las muestras se determina mediante interpolación en la curva de calibración.

**B. Lectura bicromática**

1. Lea la placa a 450 nm con respecto a un filtro de referencia configurado a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcule la media de las determinaciones por duplicado.
3. Represente en papel milimetrado o semilogarítmico los valores de DO (en las ordenadas) de cada calibrador en función de la concentración correspondiente de IL-8 (abscisas) y trace una curva de calibración por los puntos de los calibradores conectando los puntos con líneas rectas.
4. Lea la concentración de cada control y muestra mediante interpolación en la curva de calibración.
5. La reducción de datos con programas informáticos simplificará estos cálculos. Si se emplea un procesamiento automático de los resultados, se recomienda un ajuste de la curva mediante función logística de 4 parámetros.

**11. DATOS TÍPICOS**

Los datos siguientes son solo a efectos ilustrativos y no deben utilizarse nunca en lugar de la curva de calibración generada en tiempo real.

| Interleukin-8 human ELISA |            | Unidades de DO Modelo policromático |
|---------------------------|------------|-------------------------------------|
| Calibrador                | 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. EFICACIA Y LIMITACIONES****A. Límite de detección**

Se analizaron veinte calibradores cero junto con un conjunto de otros calibradores. El límite de detección, definido como la concentración aparente dos desviaciones estándar por encima del promedio de DO en la unión cero, fue de 1,1 pg/ml.

**B. Especificidad**

No se observó ninguna reacción cruzada significativa en presencia de 50 ng de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, TNF  $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF, OSM, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , LIF, MCP-1, G CSF, RANTES, PF-4,  $\beta$ TG, GRO, IP-10 y SCF. Este ensayo de IL-8 es específico para la IL-8 humana natural y recombinante, y puede reconocer la forma de 72 aminoácidos de la IL-8.

**C. Precisión**

| INTRAENSAYO |    |                      |        | INTERENSAYO |    |                      |        |
|-------------|----|----------------------|--------|-------------|----|----------------------|--------|
| Suero       | N  | <X> $\pm$ SD (pg/ml) | CV (%) | Suero       | N  | <X> $\pm$ SD (pg/ml) | CV (%) |
| A           | 12 | 102 $\pm$ 3          | 3.2    | A           | 20 | 150 $\pm$ 13         | 8.6    |
| B           | 12 | 227 $\pm$ 8          | 3.6    | B           | 20 | 442 $\pm$ 58         | 13.1   |

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

**D. Exactitud**

## PRUEBA DE RECUPERACIÓN

| Muestra | IL-8 añadida (pg/ml) | IL-8 recuperada (pg/ml) | Recuperación (%) |
|---------|----------------------|-------------------------|------------------|
| Plasma  | 0                    | 0                       | -                |
|         | 61                   | 65                      | 105              |
|         | 108                  | 127                     | 118              |
|         | 292                  | 349                     | 119              |

## PRUEBA DE DILUCIÓN

| Muestra | Dilución | Concent. teórica (pg/ml) | Concent. medida (pg/ml) |
|---------|----------|--------------------------|-------------------------|
| Plasma  | 1/1      | -                        | 678                     |
|         | 1/2      | 339                      | 272                     |
|         | 1/4      | 169                      | 148                     |
|         | 1/8      | 85                       | 82                      |
|         | 1/16     | 42                       | 40                      |

Las muestras se diluyeron con diluyente de muestras.

**E. Tiempo de demora entre el último calibrador y la dispensación de la muestra**

Como se muestra a continuación, los resultados del ensayo siguen siendo precisos incluso cuando se dispensa una muestra 30 minutos después de haber añadido los calibradores a los pocillos recubiertos.

TIEMPO DE DEMORA

| Muestra | 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    |

**F. Efecto gancho**

Una muestra a la que se añadieron 0,5 µg/ml de IL-8 arroja una DO más alta que el punto del último calibrador.

**13. CONTROL DE CALIDAD INTERNO**

- Si los resultados obtenidos para el control 1 o el control 2 no se encuentran dentro del intervalo especificado en la etiqueta del vial, no se pueden utilizar dichos resultados, salvo que se proporcione una explicación satisfactoria sobre la discrepancia.
- Cada laboratorio puede, si lo desea, realizar sus propias mezclas de muestras control, que deberían conservarse congeladas en alícuotas. Los controles que contienen azida interferirán con la reacción enzimática por lo que no se pueden utilizar.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados duplicados de las muestras deben basarse en las Buenas Prácticas de Laboratorio.
- Se recomienda analizar los controles de forma rutinaria como muestras desconocidas para medir la variabilidad del ensayo. La eficacia del ensayo debe monitorizarse con gráficas de control de calidad de los controles.
- Es una buena práctica comprobar visualmente el ajuste de la curva seleccionada por el ordenador.

**14. INTERVALOS DE REFERENCIA**

Estos valores se proporcionan solo como guía; cada laboratorio debería establecer su propio intervalo de valores normales.

Como guía, los resultados de 36 muestras de plasma EDTA de personas aparentemente sanas con bajos niveles de PCR se encontraron entre 0 y 132 pg/ml. De estas 36 muestras, en 34 se obtuvieron valores inferiores a 50 pg/ml.

**15. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS****Seguridad**

Solo para uso diagnóstico in vitro.

Los componentes de la sangre humana incluidos en este kit se han analizado mediante métodos europeos aprobados y/o métodos aprobados por la FDA, siendo negativos para HBsAg, anti-VHC y anti-VIH-1 y 2. Ningún método conocido puede ofrecer una garantía total de que los hemoderivados humanos no transmitan hepatitis, SIDA u otras infecciones. Por tanto, la manipulación de reactivos y las muestras de suero o plasma debe realizarse de conformidad con los procedimientos de seguridad locales. Todos los productos y derivados de animales se han obtenido de animales sanos. Los componentes bovinos son originarios de países en los que no se ha notificado EEB. Sin embargo, los componentes que contengan sustancias animales deben tratarse como potencialmente infecciosos. Evite el contacto con la piel de los reactivos; la solución de parada contiene HCl. En caso de contacto, lávese bien con agua. No fume, beba, coma ni use cosméticos en la zona de trabajo. No pipetee con la boca. Lleve ropa protectora y guantes desechables.








**BIBLIOGRAFÍA**

1. MATSUHUMA K., et al. (1989). **Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic 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.

**RESUMEN DEL PROTOCOLO**

|  | <b>CALIBRADORES<br/>(µl)</b> | <b>MUESTRA(S)<br/>CONTROLES (µl)</b> |
|--|------------------------------|--------------------------------------|
| Tampón de incubación   | 100                          | 100                                  |
| Calibradores (0-5)   | 100                          | -                                    |
| Muestras, controles  | -                            | 100                                  |
| Conjugado anti-IL-8-HRP  | 50                           | 50                                   |
| Incube durante 2 horas a 18-25 °C con agitación continua a 700 rpm.<br>Aspire el contenido de cada pocillo.<br>Lave 3 veces con 400 µl de solución de lavado y aspire. |                              |                                      |
| Solución cromogénica   | 100                          | 100                                  |
| Incube durante 15 minutos a 18-25 °C con agitación continua a 700 rpm.   |                              |                                      |
| Solución de parada   | 100                          | 100                                  |
| Lea en un lector de placas de microvaloración y registre la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (490 nm) frente a 630 (o 650 nm).                                     |                              |                                      |

**SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS**

| <b>Symbol</b>   | <b>English</b>                     | <b>Deutsch</b>                               | <b>Française</b>                                       | <b>Espanol</b>                              | <b>Italiano</b>                     |
|---|------------------------------------|--|--|---|-------------------------------------|
|  | European Conformity                | CE-Konformitätskennzeichnung                 | Conforme aux normes européennes                        | Conformidad europea                         | Conformità europea                  |
|  | Consult instructions for use       | Gebrauchsanweisung beachten                  | Consulter les instructions d'utilisation               | Consulte las Instrucciones                  | Consultare le istruzioni per l'uso  |
|  | In vitro diagnostic device         | In-vitro-Diagnostikum                        | utilisation Diagnostic in vitro                        | Diagnóstico in vitro                        | Per uso Diagnostica in vitro        |
|  | For research use only              | Nur für Forschungszwecke                     | Seulement dans le cadre de recherches                  | Sólo para uso en investigación              | Solo a scopo di ricerca             |
|  | Catalogue number                   | Katalog-Nr.                                  | Référence  | Número de catálogo                          | No. di catalogo                     |
|  | Lot. No. / Batch code              | Chargen-Nr.                                  | No. de lot   | Número de lote                              | Lotto no                            |
|  | Contains sufficient for <n> tests/ | Ausreichend für "n" Ansätze                  | Contenu suffisant pour "n" tests                       | Contenido suficiente para <n> ensayos       | Contenuto sufficiente per "n" saggi |
|  | Note warnings and precautions      | Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten | Avertissements et mesures de précaution font attention | Tiene en cuenta advertencias y precauciones | Annoti avvisi e le precauzioni      |
|  | Storage Temperature                | Lagerungstemperatur                          | Température de conservation                            | Temperatura de conservación                 | Temperatura di conservazione        |
|  | Expiration Date                    | Mindesthaltbarkeitsdatum                     | Date limite d'utilisation                              | Fecha de caducidad                          | Data di scadenza                    |
|  | Legal Manufacturer                 | Hersteller                                   | Fabricant  | Fabricante                                  | Fabbricante                         |
| <i>Distributed by</i>   | Distributed by                     | Vertrieb durch                               | Distribution par                                       | Distribución por                            | Distribuzione da parte di           |
|  | Version                            | Version                                      | Version  | Versión                                     | Versione                            |
|  | Single-use                         | Einmalverwendung                             | À usage unique   | Uso único                                   | Uso una volta                       |