

MONOKIT

کیت اندازه گیری IL-6 در سرم انسان
Interleukin-6 ELISA Kit 96t
Cat No: 8134-96 / Rev A1: (1402/09/25)

مقدمه:

اینترلوکین-6 (IL-6) یک سایتوکاین پیش التهابی با عملکردهای اتوکراین، پاراکراین و اندوکراین است که نقشی اساسی در تنظیم التهاب و بقای سلولی ایفا می نماید. سطوح غیر طبیعی این سایتوکاین در سرم انسان با بیماری های مختلفی شامل بیماری التهابی روده (IBD)، روماتیسم مفصلی (RA)، آسم (Asthma)، بیماری کسلمن (Castleman's Disease) و لوپوس اریتماتوز سیستمیک (SLE) در ارتباط است. همچنین، اندازه گیری سطح IL-6 در تشخیص و کنترل پاسخ های پیش التهابی در مراحل اولیه ابتلا به عفونت های ویروسی اهمیت ویژه ای دارد. در این راستا، مطالعات بالینی انجام شده ارتباط مستقیم بین سطح سرمی IL-6، التهاب ریوی و شدت علائم بیماران مبتلا به COVID-19 را مشخص نموده اند و در حال حاضر اندازه گیری غلظت IL-6 به عنوان یک شاخص التهاب ریوی در پایش و درمان بیماران به کار برده می شود. حیطة کاربرد این کیت اندازه گیری کمی غلظت IL-6 در نمونه سرم انسان به روش الیزا است.

اصول آزمایش:

این آزمایش بر اساس الیزای ساندویچ طراحی شده است. نمونه های سرم، کالیبراتورها و کنترل ها درون چاهک های حاوی آنتی بادی تثبیت شده ضد IL-6 ریخته می شوند. با اضافه شدن محلول کونژوگه آنزیمی (حاوی آنتی بادی ضد IL-6 کونژوگه شده با آنزیم HRP) به چاهک ها، برهمکنش بین آنتی ژن و آنتی بادی ها بدون هیچ رقابتی صورت می پذیرد. پس از شستشوی چاهک ها و حذف اجزاء متصل نشده، افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی را تولید می کند که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. میزان رنگ ایجاد شده و در نتیجه شدت جذب نوری با غلظت IL-6 سرم ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت IL-6 موجود در هر نمونه توسط منحنی استاندارد محاسبه می گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی آنتی بادی تثبیت شده.
 - ۲) کالیبراتور (IL-6 Cal. A-F): شش ویال با غلظت های ۰.۲، ۱.۰، ۵.۰، ۱۲.۵، ۲۵.۰ و ۶۰۰ pg/mL.
 - ۳) محلول کونژوگه آنزیمی (IL-6 Enzyme Conjugate): یک ویال ۶ میلی لیتری حاوی آنتی بادی ضد IL-6 متصل به آنزیم HRP در بافر.
 - ۴) محلول کنترل (IL-6 Control): ویال (های) ۰/۵ میلی لیتری.
 - ۵) محلول شستشو (Wash Solution-20X): یک ویال ۲۵ میلی لیتری.
 - ۶) محلول رنگزا (Substrate Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری.
 - ۷) محلول متوقف کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری.
 - ۸) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent 10X): یک ویال ۱۰ میلی لیتری.
 - ۹) برجسب مخصوص پلیت.
- توجه ۱: کلیه محلول ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.
- توجه ۲: مقادیر کنترل (ها) در برگه COA درج شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

- ۱) دستگاه خوانش گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
- ۲) سمپلر کالیبره.
- ۳) آب مقطر دیونیزه.

احتیاط در استفاده از کیت:

- ۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت ها و یا شماره های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
- ۲) کلیه محلول ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول های که تاریخ انقضاء آن ها گذشته است استفاده نشود.
- ۳) توجه فرمایید محلول ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- ۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBS Ag، HIV1/2 و HCV بررسی شده اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری زا با استفاده از روش های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل های ایمنی انجام شود.

۵) استفاده از دستکش، عینک و ماسک در هنگام کار الزامی است. در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جلوگیری نمایید.

۶) نمونه بیماران، کنترل ها، چاهک ها و سر سمپلر های استفاده شده باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع آوری، آماده سازی و نگهداری نمونه:

- ۱) نمونه مناسب برای این تست سرم است. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول های خونی جدا گردد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه گیری در درستی نتایج به دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. حتی الامکان از نمونه های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نشود.
- ۲) درب ظرف نمونه ها باید کاملاً بسته باشد. ترجیحاً از نمونه تازه استفاده شود. حداکثر می توان نمونه ها را تا ۳ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری کرد. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه ها خودداری نمایید.
- ۳) نمونه هایی که غلظت آن ها بیشتر از 600 pg/mL است را توسط محلول رقیق کننده نمونه آماده مصرف (بخش آماده سازی و نگهداری معرف ها را مطالعه فرمایید) رقیق نمایید و نتیجه نهایی را با در نظر گرفتن ضریب رقت گزارش کنید.

آماده سازی و نگهداری معرف ها:

- ۱) آماده سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۵ میلی لیتر از محلول شستشو (20X) را به ۴۷۵ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید.
- در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بین ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.
- ۲) آماده سازی محلول رقیق کننده نمونه: مقدار مورد نیاز از محلول رقیق کننده نمونه (10X) را به نسبت ۱:۹ با آب مقطر دیونیزه رقیق کنید. به عنوان مثال، برای تهیه یک میلی لیتر محلول آماده مصرف، حجم ۱۰۰ میکرو لیتر محلول رقیق کننده نمونه (10X) را به ۹۰۰ میکرو لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه کنید.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی گراد) رسیده اند. کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.

۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک ها را به همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۵۰ میکرو لیتر از کالیبراتورها، کنترل یا نمونه ها را در چاهک های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک ها ریخته شود.

۳) حجم ۵۰ میکرو لیتر کونژوگه آنزیمی به تمام چاهک ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴) چاهک ها را با برجسب مخصوص پلیت بشویند و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک ها را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید و به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت گیر بزنید. سپس چاهک ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرو لیتر محلول شستشوی آماده مصرف (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) بشویند. در اولین مرتبه شستشو، پس از اضافه کردن محلول شستشو، پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی بر روی میز تکان دهید و سپس محلول شستشو را تخلیه کنید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت گیر بزنید. به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت اقدام نمایید.

۸) حجم ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک ها بریزید و پلیت را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

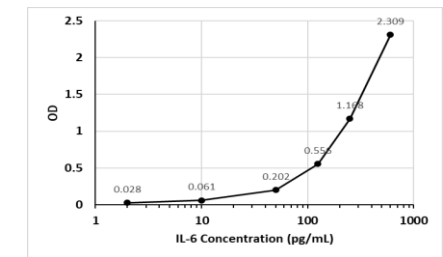
۹) حجم ۵۰ میکرو لیتر محلول متوقف کننده واکنش به کلیه چاهک ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

1. <http://www.samantajhiz.com/Support.aspx>

۱۰) شدت جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر، حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). در این آزمایش از روش 4PL (یا Logic-log) برای محاسبه غلظت استفاده نمایید. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

توجه: در صورت عدم امکان استفاده از نمودار 4PL، نمودار Point to Point نیز جهت محاسبه غلظت قابل استفاده می باشد.

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (pg/mL)
Cal. A	A1	0.026	0.028	2
	B1	0.031		
Cal. B	C1	0.059	0.061	10
	D1	0.063		
Cal. C	E1	0.203	0.208	50
	F1	0.214		
Cal. D	G1	0.569	0.556	125
	H1	0.544		
Cal. E	A2	1.142	1.168	250
	B2	1.195		
Cal. F	C2	2.291	2.309	600
	D2	2.328		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای IL-6

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر باید برای آنالیت مورد نظر توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

Normal Range (pg/mL)	
Normal	< 7
Borderline	7 - 20
Unnormal	>20

پارامترهای کنترل کیفی

۱) بررسی دقت - آزمون دقت درون دور (Within-Run)

دقت درون دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean IL-6 (pg/mL)	4.28	11.1	125.1
SD (pg/mL)	0.24	0.61	6.1
CV (%)	5.6	5.4	4.8

۲) بررسی دقت - آزمون دقت بین دور (Between-Run)

دقت بین دور با ارزیابی تجدید پذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean IL-6 (pg/mL)	5.1	13.1	120.1
SD (pg/mL)	0.32	0.72	5.99
CV (%)	6.2	5.5	4.9

۳) بررسی درستی - آزمون بازیابی (Recovery)

در این تست به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به عنوان یک نمونه، غلظت IL-6 در آن اندازه گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 10\%$ نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (pg/mL)	Added (pg/mL)	Exp. (pg/mL)	Obs. (pg/mL)	% Rec.
1	3.6	24.6	14.1	14.66	103.9
2	29.11	114.4	71.7	71.12	99.1
3	129.7	4.4	67.0	66.01	98.5

۴) بررسی درستی - آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست غلظت IL-6 در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 10\%$ است.

No.	Sample (pg/mL)	% Bias			
		1/2	1/4	1/8	1/16
1	146.1	-0.9	2.1	1.9	3.2
2	67.11	1.5	-2.8	2.1	-3.4
3	47.3	1.8	-1.7	2.2	-3.1

۵) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با pg/mL تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645 SD_b$$

$$LOB = Mean_b + 1.645 SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

۶) بررسی درستی - آزمون مقایسه روش‌ها

(Comparison of Methods)

جهت بررسی صحت نتایج این کیت، میزان IL-6 در ۱۰۰ نمونه سرم با مقادیر پایین، نرمال و بالا توسط این کیت اندازه گیری شد و نتایج آن با کیت مرجع مقایسه و ضریب همبستگی بین نتایج به دست آمده از دو کیت، براساس روش Pearson، ۰/۹۹۷ محاسبه گردید. معیار پذیرش برای این آزمایش به صورت زیر تعریف شده است:

$$0.9 \leq \text{Pearson Correlation Coefficient} \leq 1.0$$

۷) بررسی ویژگی - آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)

ویژگی کیت با اضافه کردن مواد مندرج در جدول زیر به نمونه سرم بررسی شد. نتایج حاصل از اندازه گیری نسبت مقدار ماده اضافه شده به مقدار IL-6 مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، نشان دهنده عدم واکنش متقاطع (< 0.001) بود. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده $10 \pm 10\%$ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Analyte	Concentration	% Reactivity
IL-1 α	50 ng/mL	<0.001
IL-1 β	50 ng/mL	<0.001
Luteinizing Hormone	250 mIU/mL	<0.001
Follicle Stimulating Hormone	100 mIU/mL	<0.001
Human Chorionic Gonadotropin	1000 mIU/mL	<0.001
Prolactin	100 pg/mL	<0.001

۸) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.
In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

Shelf Stability Test:

بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می باشد. مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

	Manufacturer
	Use-by date
	Batch code
	In vitro diagnostic medical device
	Own brand Labeling
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

- McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
- Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
- Tietz. Reference information for the clinical laboratory. Hn Textbook of clinical chemistry. Burtis, CA, Ashwood, RA, WB, Saunders. Philadelphia; 1999.

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.