

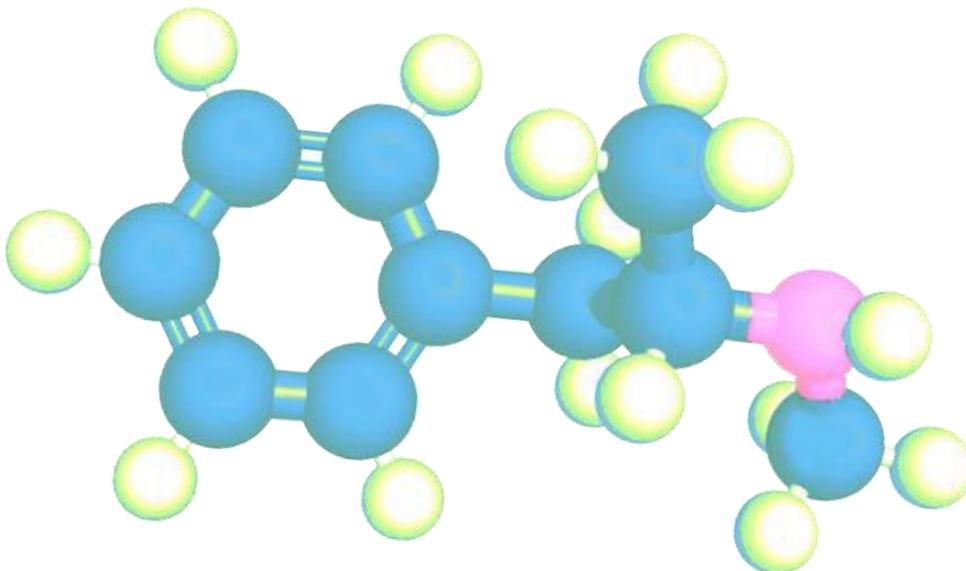
IL6/ELISA

Kit de ELISA para la detección de Interleucina 6 en suero/plasma

Hoja de datos del producto.

Para uso exclusivo en investigación.

Almacenamiento de 2 a 8 °C.



Contenido

1. Uso deseado	3
2. Resumen	3
3. Principio de la prueba	3
4. Reactivos y materiales suministrados	4
5. Reactivos y materiales requeridos, pero no suministrados ..	4
6. Almacenamiento y estabilidad del kit	4
7. Preparación de reactivos suministrados	4
8. Recolección de la muestra	¡Error! Marcador no definido.
9. Procedimiento del ensayo	5
10. Interpretación de resultados	5
11. Control de Calidad	6
12. Limitaciones del procedimiento	6
13. Características de desempeño	6
14. Precauciones y seguridad	7
15. Resumen del procedimiento	8
16. Referencias	9
17. Emisión	9
18. Simbología utilizada	10

Este kit es fabricado por:

Amunet S.A. de C.V.

IL6/ELISA

Kit de ELISA para la detección de Interleucina 6 en suero/plasma

1. Uso deseado

Kit de ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) para la detección cualitativa de Interleucina 6 en muestras de suero o plasma. Prueba inmunoenzimática *in vitro*.

"Solo para uso en investigación. No para uso en procedimientos de diagnóstico".

2. Resumen

La interleucina 6 (IL-6) es una citoquina clave en el sistema inmunitario con funciones muy variadas. Estímulos como infecciones, lesiones (ej. una quemadura) u otras citoquinas como la interleucina 1 favorecen la síntesis de la interleucina 6 en células T, macrófagos, fibroblastos o incluso en células musculares. Además, media la fiebre y de la llamada reacción de fase aguda, proceso en el cual se activa o inhibe respectivamente la producción de determinadas proteínas en el hígado (u otros órganos). Estas proteínas juegan un papel importante en la regulación de la función inmune, así como en procesos de coagulación y reparación de heridas. También es importante destacar la acción de la IL-6 sobre los linfocitos B, en los que favorece la síntesis de anticuerpos.

Por otro lado, esta citoquina juega un papel muy importante en la regulación de los denominados linfocitos TH17 y T reguladores. Los primeros tienen una función crucial en la protección contra las infecciones bacterianas, mientras que los segundos se encargan de suprimir la actividad del sistema inmune. La interleucina 6 participa junto con otras citoquinas, en la activación de los linfocitos TH17 y la inhibición de los T reguladores.

No obstante, la IL-6 también es capaz de controlar la amplitud de la respuesta inflamatoria aguda, ejerciendo, por tanto, también un efecto antiinflamatorio.

Una disminución de los niveles de la IL-6 se asocia con una defensa deficiente frente a diversos patógenos. Por el contrario, su sobreproducción puede ser el causante primario de muchas enfermedades inflamatorias y autoinmunes, como la artritis, esclerosis múltiple u osteoporosis. Es por ello que es de vital importancia controlar los niveles de esta citoquina, sobre todo en aquellas patologías en las que la IL-6 está implicada.

3. Principio de la prueba

Este ensayo emplea la técnica de inmunoensayo enzimático cuantitativo tipo sándwich. Un anticuerpo anti-IL6 humana de tipo específico y monoclonal se ha recubierto previamente a la microplaca. Los estándares y muestras son se pipetea en los pocillos y cualquier IL-6 presente se une al anticuerpo inmovilizado. Después del lavado donde se cualquier sustancia no unida, se utiliza un anticuerpo policlonal ligado a enzimas específico para la IL-6 humana, el cual es añadido a los pozos. Después de un lavado para eliminar cualquier reactivo anticuerpo-enzima no unido, se utiliza un sustrato. Se agrega la solución a los pocillos y el color se desarrolla en proporción a la cantidad de IL-6 unida en el paso inicial. Se detiene el desarrollo del color y se mide la intensidad del color.

4. Reactivos y materiales suministrados

Tabla 1. Cantidad de reactivos suministrados.

Reactivos y materiales del kit	No. de contenedores/ unidades	Cantidad
Placa ELISA 12 x 8 pozos ¹	1 microplaca de 96 pozos ²	No Aplica
Buffer de Lavado (10X)	1 frasco	25 mL
Solución de conjugado ³	1 tubo	8 µL
Solución diluyente	1 frasco	15 mL
Sustrato (TMB) ³	1 tubo	10 mL
Solución de Paro	1 tubo	10 mL
Control Negativo	1 tubo	500 µL
Control Positivos	5 tubos	500 µL c/u

1. Las tiras de pozos se pueden usar por separado.

2. Se presenta en un soporte para pozos blanco y sellado en una bolsa de aluminio con desecante.

3. Proteger de la luz para su almacenamiento o podría comprometerse los resultados.

5. Reactivos y materiales requeridos, pero no suministrados

- Agua bidestilada
- Micropipetas y puntas desechables para micropipeta.
- Depósitos de reactivos y buffer (RPBI).
- Toallas de papel o papel absorbente.
- Lector de microplacas/Espectrofotómetro con capacidad para leer la absorbancia a 450 nm o doble longitud de onda a 450/600 ~ 650 nm.
- Papel adherente para cubrir la placa.
- Microcentrífuga

6. Almacenamiento y estabilidad del kit

El kit debe almacenarse a 2-8 °C a su recepción, en su caja, evitando exposiciones de luz. Todos los reactivos deben equilibrarse a temperatura ambiente antes de su uso. Se debe retirar las tiras recubiertas de antígeno no utilizadas de la microplaca, devolverlas a la bolsa de aluminio con su desecante y sellar la bolsa nuevamente. Una vez abiertas, las tiras pueden almacenarse a 2-8 °C por hasta un mes. Para asegurar el máximo rendimiento, proteja los reactivos de la contaminación con microorganismos o productos químicos durante el almacenamiento.

7. Preparación de reactivos suministrados

• Solución de lavado

Prepare Solución de lavado 1X: Contemple el volumen de solución a utilizar y prepare. Por cada 1 mL de Solución de lavado a preparar coloque 0.1 mL de Solución de lavado 10X y 0.9 mL de agua bidestilada. Si se observan precipitados en el frasco de la Solución de lavado 10X, caliente el contenedor en un baño maría a 37 °C y mezcle hasta que desaparezcan los precipitados. La solución de lavado 1X se puede almacenar a 2-8 °C hasta por un mes.

• Solución de conjugado

Prepare Solución: Contemple la solución a utilizar y prepare. Por cada 200 µL de Solución A a preparar coloque 1 µL de Solución A concentrada y 199 µL de Solución diluyente. La solución es poco estable y siempre se debe preparar al momento de usar.

8. Procedimiento del ensayo

El kit IL6/ELISA se ha desarrollado utilizando procedimientos de lavado y pipeteo manuales.

Equilibre todos los reactivos a temperatura ambiente (20-25 °C) durante al menos 30 minutos, antes de usar.

El ensayo se realiza por duplicado.

1. Prepare todos los reactivos y estándares de trabajo como se indica en las secciones anteriores.
2. Retire el exceso de tiras de microplacas del marco de la placa y regréselas a la bolsa de aluminio que contiene el paquete desecante y vuelva a sellar.
3. Agregue 100 µL de diluyente de ensayo a cada pocillo.
4. Agregue 100 µL de estándar, control o muestras por pocillo. Cubrir la placa.
5. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
6. Retire el líquido de cada pocillo y lave, repitiendo el proceso tres veces para un total de cuatro lavados. Lave llenando cada pocillo con tampón de lavado (400 µl) usando una botella con atomizador, colector dispensador o lavadora automática. La eliminación completa del líquido en cada paso es esencial para una buena actuación. Después del último lavado, elimine cualquier resto de tampón de lavado aspirando o decantando. Invierta el plato y séquelo con toallas de papel limpias.
7. Agregue 200 µL de conjugado de IL-6 humana a cada pocillo. Cubrir con una nueva tira adhesiva. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Repita la aspiración/lavado como en el paso 6.
8. Agregue 200 µL de solución de sustrato a cada pocillo. Incubar durante 20 minutos en la habitación temperatura. Proteger de la luz.
9. Agregue 50 µL de solución de parada a cada pocillo. El color de los pocillos debería cambiar de azul a amarillo. Si el color de los pocillos es verde o el cambio de color no parece uniforme. Golpee suavemente la placa para asegurar una mezcla completa.
10. Determine la densidad óptica de cada pocillo en 30 minutos, utilizando un lector de microplacas ajustado a 450 nm. Si la corrección de longitud de onda está disponible, configúrela en 540 nm o 570 nm. Si la longitud de onda corrección no está disponible, reste las lecturas a 540 nm o 570 nm de las lecturas a 450 nm. Esta resta corregirá las imperfecciones ópticas de la placa. Lecturas realizadas directamente a 450 nm sin corrección puede ser mayor y menos preciso.

10. Interpretación de resultados

- a) Promediar las lecturas de los duplicados
- b) Identificar que los resultados de los Controles suministrados correspondan a lo esperado según la tabla 2.
- c) Analizar los resultados obtenidos por las muestras e identificar si es positivo o en su caso negativo.

Tabla 2. Promedio de los valores esperados

Muestra/Control	Valor de D.O. esperado a 450 nm
Control negativo	≥ 2.0
Control positivo	≤ 1.0
Muestras NEGATIVAS	≥ 2.0
Muestras POSITIVAS a	≤ 1.0

11. Control de Calidad

- Cada microplaca debe considerarse por separado al calcular e interpretar los resultados del ensayo, independientemente del número de placas procesadas simultáneamente.
- Los resultados de la prueba son válidos si se cumplen los criterios de control de calidad (los valores de los controles concuerdan con los resultados esperados).
- Si no se cumplen los criterios para los controles, el resultado debe ser cuestionado y se tendrá que repetir el ensayo.
- Se recomienda que cada laboratorio establezca un sistema de control de calidad apropiado con material de control de calidad similar o idéntico a la muestra analizada.

12. Limitaciones del procedimiento

- La presencia de azida de sodio en la muestra afecta los resultados del ensayo. La azida de sodio no se debe utilizar como conservador de muestras.
- Si la microplaca no se lava adecuadamente o presenta líquidos residuales, puede causar alteraciones a los resultados.
- Si el intervalo de tiempo de adición de muestra o reactivos es demasiado largo, puede causar alteraciones a la prueba y los resultados.
- Las muestras de orina con demasiado sedimento deben ser centrifugadas para retirar interferentes.
- Una mala preparación de las soluciones A y/o B puede causar alteraciones a los resultados.
- Las soluciones concentradas deben almacenarse adecuadamente para evitar resultados erróneos.

13. Características de desempeño

- **Sensibilidad y especificidad con muestras clínicas**

Se realizó un análisis comparativo usando el kit IL6/ELISA de Amunet y otro ELISA para detección de Anfetamina disponible en el mercado. El examen fue hecho a 88 especímenes clínicos recolectados con anterioridad con sujetos presentes para pruebas de detección de drogas. Los resultados se presentan a continuación:

Método		Otra ELISA		Total de resultados
IL6/ELISA	RESULTADO	Positivo (+)	Negativo (-)	
	Positivo (+)	31	0	31
	Negativo (-)	1	52	53
Total de Resultados		32	52	84

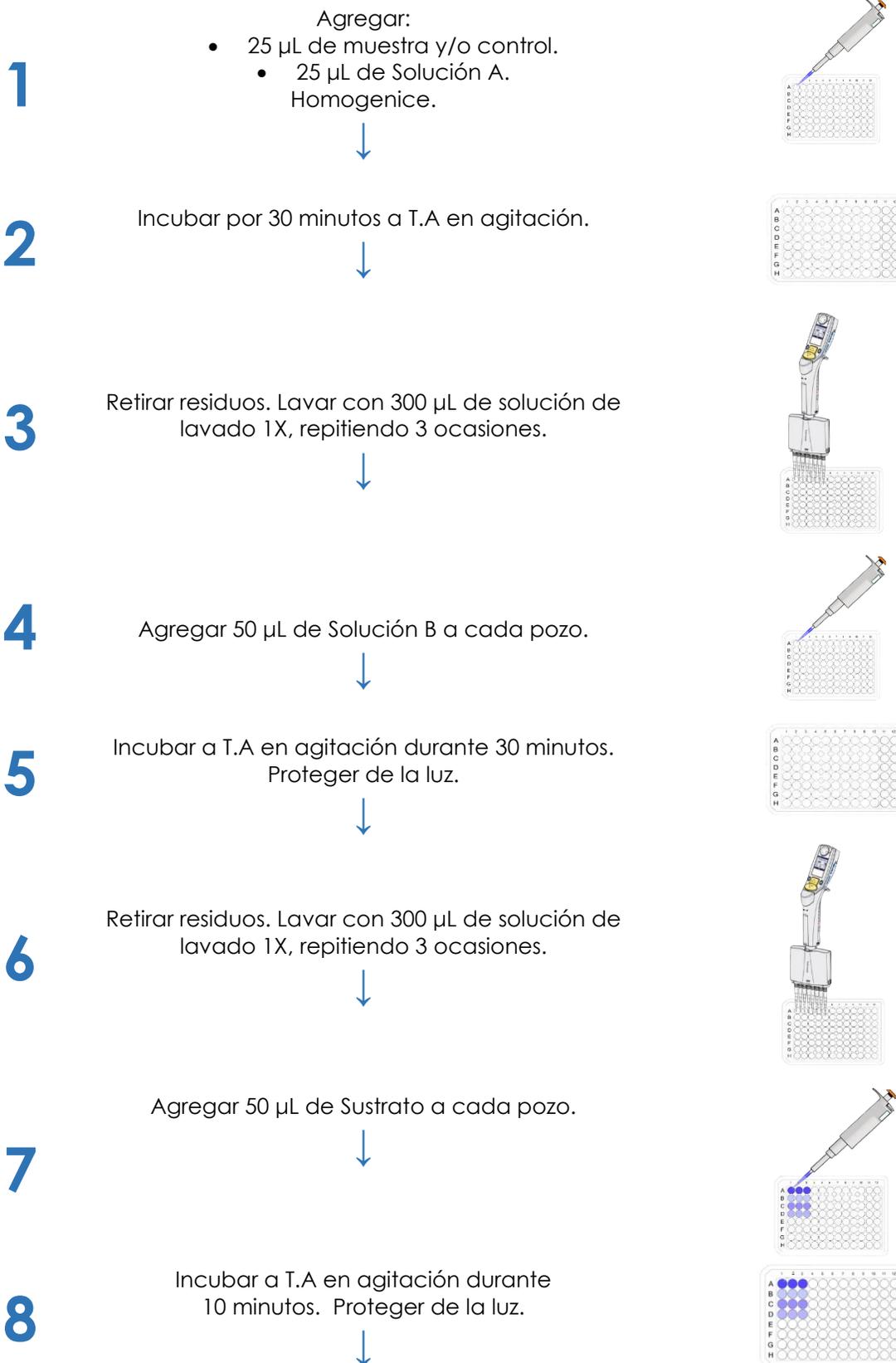
- Sensibilidad: 96.88% (95% CI: 90.65% ~ 99.00%)
- Especificidad: 100% (95% CI: 95.63% ~ 100%)

14. Precauciones y seguridad

Los ensayos ELISA son sensibles al tiempo y a la temperatura. Para evitar resultados incorrectos, se recomienda seguir los pasos del procedimiento de ensayo.

1. No intercambie reactivos de diferentes lotes ni use reactivos de otros kits disponibles comercialmente. Los componentes del kit se combinan con precisión para un rendimiento óptimo de los ensayos.
2. Asegúrese de que todos los reactivos no presenten fecha de caducidad vencida (indicada en la caja del kit). No use reactivos con fecha de caducidad vencida (indicada en las etiquetas o caja).
3. Paso crítico. Permita que los reactivos y las muestras alcancen la temperatura ambiente (20-25 °C) antes de su uso. Agite el reactivo suavemente antes de usar teniendo la precaución de no generar espuma. Regrese a 2-8 °C inmediatamente después de su uso.
4. Use solo el volumen suficiente de muestra cómo se indica en los pasos del procedimiento de ensayo, de lo contrario, puede provocar baja sensibilidad del ensayo.
5. No toque el fondo exterior de los pozos, las huellas digitales o los rasguños pueden interferir con la lectura. Al leer los resultados, asegúrese de que el fondo de la placa esté seco y que no haya burbujas de aire dentro de los pozos.
6. Nunca permita que los pozos de la microplaca se sequen después del paso de lavado. Inmediatamente proceda al siguiente paso. Evite la formación de burbujas de aire al agregar los reactivos.
7. Evite interrupciones prolongadas de los pasos del ensayo. Asegure las mismas condiciones de trabajo para todos los pozos.
1. Calibre la pipeta con frecuencia para asegurar la precisión de la distribución de muestras/reactivos. Cambie puntas entre muestras y reactivos para evitar contaminaciones cruzadas.
2. Al agregar muestras o reactivos, no toque el fondo del pozo con la punta de la pipeta.
3. Mida con un lector de placa o espectrofotómetro, determine la absorbancia a 450 nm.
4. La actividad enzimática del conjugado HRP podría verse afectada por el polvo y los químicos reactivos y/o sustancias como hipoclorito de sodio, ácidos, álcalis, etc. No realice el ensayo en presencia de estas sustancias y utilice siempre puntas nuevas.
5. Todas las muestras de origen humano deben considerarse potencialmente infecciosas. El cumplimiento estricto de las BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) puede garantizar la seguridad del personal.
6. Nunca coma, beba, fume o aplique cosméticos en el laboratorio de análisis.
7. Los productos químicos deben manipularse y eliminarse solo de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio vigentes y las reglamentaciones locales o nacionales aplicables.
8. Algunos reactivos pueden causar toxicidad, irritación, quemaduras o tener un efecto cancerígeno. Se debe evitar el contacto con la piel y mucosas.
9. La solución de paro es un ácido, úselo con el cuidado apropiado, limpie los derrames inmediatamente y lave sus manos con abundante agua si entra en contacto con la piel o los ojos.
10. No pipetear con la boca. Tome las precauciones normales requeridas para el manejo de reactivos de laboratorio.
11. Los reactivos deben ser utilizados únicamente para el propósito previsto por personal de laboratorio debidamente calificado, en condiciones de laboratorio apropiadas.

15. Resumen del procedimiento



9

Agregar 50 µL de solución de paro a cada pozo.



10

Medir la absorbancia de cada pozo a 450 nm.



11

Interprete los resultados.

Positivo
 Negativo

16. Referencias

- [1]. Anfetamina Baselt RC. En Disposición de Drogas Tóxicas y Químicos en el Hombre. 8.ª edición, Publicaciones biomédicas, Foster City, California, 2008, págs. 85-87.
- [2]. EMCDDA : Anfetamina. <http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/amphetamine>
- [3]. Análisis de Clarkes de drogas y venenos: anfetamina. www.medicinescomplete.com
- [4]. Polkis A, Still J, Slattum PW, Edinboro LF, Saady JJ, Costantino A. Excreción urinaria de d-anfetamina después de dosis orales en humanos: Implicaciones para las pruebas de drogas en orina. J.Anal. tóxicos 1998; 22; 481-486. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9788523>

17. Emisión

EAN 0722/01

REF KEIL601

18. Simbología utilizada

Símbolo	Descripción
	Número de catálogo
	Lote
	Fabricante
	Fecha de fabricación
	Fecha de caducidad
	No use si el empaque se encuentra dañado
	Consulte instrucciones de uso
	Temperatura límite 2°C~8°C.
	Contiene 96 pozos
	No se reúse
	Precaución
	Mantener seco

Para más información ingresa a:

www.amunet.com.mx



amunet