

کیت اندازه‌گیری IL-6 در سرم انسان  
**Interleukin-6 ELISA Kit 96t**  
 Cat No: 8124-96 / Rev A2: (1402/09/22)

#### 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 می‌نماید. سطوح غیر طبیعی این سایتوکاین در سرم انسان با بیماری‌های مختلفی شامل بیماری التهابی روده (IBD)، روماتیسم مفصلی (RA)، آسم (Asthma)، بیماری کسلمان (Castleman's Disease) و لوپوس اریترماتوز سیستمیک (SLE) در ارتباط است. همچنین، اندازه‌گیری سطح سیستمیک IL-6 در تشخیص و کنترل پاسخ‌های پیش التهابی در مراحل اولیه ابتلا به عفونت‌های ویروسی اهمیت ویژه‌ای 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 نموده‌اند و در حال حاضر اندازه‌گیری غلظت IL-6 به‌عنوان یک شاخص التهاب ریوی در پایش و درمان بیماران به‌کار برده می‌شود. حیطة کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی غلظت IL-6 در نمونه سرم انسان به روش الایزا است.

#### اصول آزمایش:

این آزمایش بر اساس الایزای ساندویچ طراحی شده است. نمونه‌های سرم، کالیبراتورها و کنترل‌ها درون چاهک‌های حاوی آنتی‌بادی تثبیت شده ضد IL-6 ریخته می‌شوند. با اضافه شدن محلول کونژوگه آنزیمی (حاوی آنتی‌بادی ضد IL-6 کونژوگه شده با آنزیم HRP) به چاهک‌ها، برهمکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی‌ها بدون هیچ رقابتی صورت می‌پذیرد. پس از شستشوی چاهک‌ها و حذف اجزاء متصل نشده، افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی را تولید می‌کند که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. در نهایت غلظت IL-6 موجود در هر نمونه توسط منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

#### محتویات کیت:

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی آنتی‌بادی تثبیت شده.
  - ۲) کالیبراتور (IL-6 Cal. A-F): شش ویال با غلظت‌های ۲، ۱۰، ۵۰، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۶۰۰ pg/mL
  - ۳) محلول کونژوگه آنزیمی (IL-6 Enzyme Conjugate): یک ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی ضد IL-6 متصل به آنزیم HRP در بافر.
  - ۴) محلول کنترل (IL-6 Control): ویال (های) ۰/۵ میلی‌لیتری.
  - ۵) محلول شستشو (Wash Solution-20X): یک ویال ۲۵ میلی‌لیتری.
  - ۶) محلول رنگزا (Substrate Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
  - ۷) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
  - ۸) محلول رقیق‌کننده نمونه (Sample Diluent 10X): یک ویال ۱۰ میلی‌لیتری.
  - ۹) برجسب مخصوص پلیت.
- توجه ۱: تمام محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است. توجه ۲: مقادیر کنترل (ها) در 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 کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری کنید.
- ۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.
- ۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- ۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBS Ag، HIV1/2 و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شود.

۵) استفاده از دستکش و عینک 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 جداً جلوگیری کنید.

۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

#### جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

- ۱) نمونه مناسب برای این تست سرم است. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود.
- ۲) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. ترجیحاً از نمونه تازه استفاده شود. حداکثر می‌توان نمونه‌ها را تا ۳ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری نمایید.
- ۳) نمونه‌هایی که غلظت آن‌ها بیشتر از 600 pg/mL است را توسط محلول رقیق‌کننده نمونه آماده مصرف (بخش آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها را مطالعه فرمایید) رقیق نمایید و نتیجه نهایی را با در نظر گرفتن ضریب رقت گزارش کنید.

#### آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:

- ۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۵ میلی‌لیتر از محلول شستشو (20X) را به ۴۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.

۲) آماده‌سازی محلول رقیق‌کننده نمونه: مقدار مورد نیاز از محلول رقیق‌کننده نمونه (10X) را به نسبت ۱:۹ با آب مقطر دیونیزه رقیق کنید. به‌عنوان مثال، برای تهیه یک میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول رقیق‌کننده نمونه (10X) را به ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه اضافه کنید.

#### روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت، کنترل و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت کنید.

- ۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک‌ها را به‌همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.
- ۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، کنترل یا نمونه‌ها را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.
- ۳) حجم ۵۰ میکرولیتر کونژوگه آنزیمی به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
- ۴) چاهک‌ها را با برجسب مخصوص پلیت بشویند و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- ۵) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید و به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) بشوید. در اولین مرتبه شستشو، پس از اضافه کردن محلول شستشو، پلیت را به‌مدت ۲۰ ثانیه به آرامی بر روی میز تکان دهید و سپس محلول شستشو را تخلیه کنید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت اقدام نمایید.

1. <http://www.idealdiag.com/Training.aspx>

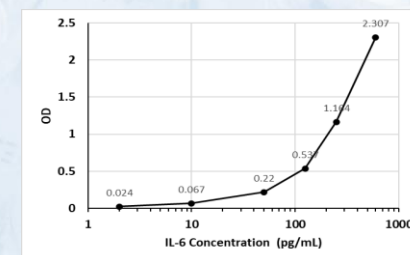
۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهکها بریزید و پلیت را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید. توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۷) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه چاهکها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

۸) 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 می‌باشد.

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (pg/mL)
Cal. A	A1	0.022	0.024	2
	B1	0.026		
Cal. B	C1	0.066	0.068	10
	D1	0.070		
Cal. C	E1	0.216	0.220	50
	F1	0.224		
Cal. D	G1	0.547	0.537	125
	H1	0.527		
Cal. E	A2	1.116	1.164	250
	B2	1.212		
Cal. F	C2	2.280	2.307	600
	D2	2.333		



### 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)	3.4	13.2	134.0
SD (pg/mL)	0.17	0.61	5.59
CV (%)	5.0	4.6	4.2

#### 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)	5.9	14.1	116.3
SD (pg/mL)	0.34	0.75	5.12
CV (%)	5.8	5.3	4.4

#### 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 اندازه‌گیری 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	3.3	31.5	17.4	16.5	94.8
2	3.3	142.2	72.75	79.2	108.9
3	31.5	142.2	86.85	80.0	92.11

#### ۴) بررسی درستی - آزمون خطی بودن (Linearity)

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

No.	Sample (pg/mL)	% Bias			
		1/2	1/4	1/8	1/16
1	130.6	-0.8	1.1	1.7	1.9
2	85.4	1.1	-2.2	2.6	-3.4
3	40.3	-1.3	1.5	-1.3	-2.5

#### 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  $2/5 \text{ pg/mL}$  تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

$$LOB = Mean_b + 1.645 SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

#### ۶) بررسی درستی - آزمون مقایسه روش‌ها

##### (Comparison of Methods)

جهت بررسی ویژگی این کیت، میزان IL-6 در ۱۰۰ نمونه سرم با مقادیر پایین، نرمال و بالا توسط این کیت اندازه‌گیری شد و نتایج آن با کیت مرجع مقایسه و ضریب همبستگی بین نتایج به دست آمده از دو کیت، براساس روش Pearson،  $0.997$  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 اندازه‌گیری نسبت مقدار ماده اضافه شده به مقدار IL-6 مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، نشان‌دهنده عدم واکنش متقاطع ( $< 0.001$ ) بود. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده  $10 \pm 100$  درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Analyte	Concentration	% Reactivity
IL-1 $\alpha$	50 ng/mL	<0.001
IL-1 $\beta$	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 می‌باشد. مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد 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 برجسب کالاها

	Manufacturer
	Use-by date
	Batch code
	In vitro diagnostic medical device
	Catalogue number
	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.