

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA

División de estudios de Posgrado e Investigación
Secretaría de Salud
Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán

11215
22
2es.

MARCADORES SEROLOGICOS DE GRAVEDAD EN PANCREATITIS AGUDA

TRABAJO DE INVESTIGACION

QUE PRESENTA

Dr. Jorge Manuel Suazo Barahona

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN

GASTROENTEROLOGIA

Director del Curso: Dr. Guillermo Robles Díaz
Tutor: Dr. Guillermo Robles Díaz

G. Robles

1998

268609

TESIS CON
FALLA DE OR.GEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mi madre Yolanda Barahona de Suazo, a quien no solo le debo la vida sino que todo el apoyo y ejemplo que siempre me ha dado.

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso, sin quien las cosas en este Mundo no serían posibles.

A mi esposa Sandra, por apoyarme siempre a seguir adelante.

A mis hermanos Roberto, Sergio, Luis y Marcela quienes le dan el buen significado a la palabra familia.

Al Dr Guillermo Robles, con gran estimación por todas sus enseñanzas, apoyo y amistad.

A Tere, Mario y Ricardo sin quienes este trabajo no hubiera sido posible.

A todo el personal del departamento de Gastroenterología, una verdadera familia que me recibió con los brazos abiertos.

INDICE

1. Antecedentes.....	5
2. Definición del problema.....	8
3. <i>Justificación</i>	9
4. Objetivos.....	10
5. Hipótesis.....	11
6. Material y métodos.....	12
7. Resultados.....	17
8. Discusión.....	22
9. Conclusiones.....	28
10. <i>Bibliografía</i>	29
11. Figuras, tablas y anexos.....	34

ANTECEDENTES

En diversos estudios clínicos se ha observado que entre una tercera y una quinta parte de los pacientes que presentan pancreatitis aguda (PA) desarrollan cuadros graves (1,2,3). En estos casos el pronóstico del enfermo se ensombrece reportándose una mortalidad de alrededor del 30% (1). Esto ha originado la búsqueda de predictores de gravedad como criterios múltiples o estudios de laboratorio que seleccionen de manera adecuada al enfermo en riesgo de complicarse. Inicialmente se consideró que las manifestaciones de la PA y sus complicaciones sistémicas eran secundarias al efecto de la liberación de las diversas enzimas pancreáticas, sin embargo los estudios realizados no mostraron correlación entre gravedad del cuadro y el nivel sérico de las enzimas (4). Estudios realizados desde 1990 demostraron que el fenómeno de autodigestión tisular provocado por las enzimas pancreáticas estimula la producción de citocinas que son las responsables de las manifestaciones sistémicas de la PA (5).

La pancreatitis aguda grave (PAG) se manifiesta por el desarrollo de un síndrome de respuesta sistémica inflamatoria, que se acompaña a nivel circulatorio de la liberación de diversos tipos de mediadores de inflamación y reactantes de fase aguda, que traducen el compromiso orgánico observado (5). El daño que se presenta en pancreatitis aguda (PA), tanto local (páncreas y tejidos peripancreáticos) como a distancia (compromiso de otros órganos y sistemas) es muy variable y tiene repercusiones pronósticas importantes. En la actualidad existen diversos estudios que intentan investigar los factores que inciden de manera relevante en el daño orgánico y por lo tanto la gravedad de la enfermedad. La atención se ha centrado sobre todo en marcadores séricos de gravedad como la proteína C reactiva (PCR), la proteína asociada a la pancreatitis (PAP) y recientemente las interleucinas (IL) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

Los niveles de PCR en suero se han analizado ampliamente en varios estudios clínicos y se ha observado en forma consistente que es uno de los que tienen mejor sensibilidad y especificidad como marcador único de predicción de gravedad o complicaciones en estos enfermos (6, 7), en especial se ha demostrado que sus niveles correlacionan con el grado de necrosis que se presenta

en el tejido pancreático y por lo tanto con la gravedad del cuadro (6). La PCr es un reactante de fase aguda que suele incrementarse 24 horas después del aumento de la IL-6 (alrededor de 48 horas después de iniciada una PA) (8). Las concentraciones de PCr se han correlacionado con los de la IL-6 durante la evolución de la PA en la mayoría de los estudios informados (8-10), precediendo la elevación de ésta última al pico máximo de PCr, por lo que algunos autores proponen la combinación de ambos como marcadores pronósticos, dependiendo del tiempo de evolución de la PA (8).

La PAP es una proteína secretada por el páncreas exocrino como respuesta al daño agudo, por lo que también se considera un reactante de fase aguda más específico de patología pancreática (11). Se ha demostrado que en sujetos normales los niveles de PAP circulantes son casi indetectables, sin embargo, durante una PA su síntesis aumenta significativamente a diferencia de sujetos con abdomen agudo por otras etiologías (11,12). Se ha estudiado su utilidad como predictor de gravedad en PA con resultados controveriales. Iovanna y cols. encontraron que los niveles de PAP correlacionan de manera satisfactoria con la gravedad del cuadro (13), lo que no se pudo corroborar en el estudio de Pezzilli y cols (14) ni en el de Kempainen y cols. (15).

En las unidades de terapia intensiva (UTI) se ha observado que existe similitud en el comportamiento hemodinámico de los enfermos con PAG y aquellos con sepsis (5). Esto provocó que se investigara el papel que juegan las IL en la fisiopatología de la PA, ya que tienen una participación preponderante en la sepsis. Las IL más estudiadas en PA han sido las pro-inflamatorias IL-1, IL-6 e IL-8 y la anti-inflamatoria IL-10 (8, 9, 16, 17). Tanto en ratas como en humanos se ha observado que los niveles de IL-1, IL-6 e IL-8 se encuentran elevados en PA y que dicho incremento es aún más marcado cuando es grave (8, 17, 18). Así mismo, se ha demostrado que el bloqueo del receptor de IL-1 antes o inmediatamente después de provocar pancreatitis experimental disminuye el incremento de todas estas citocinas, así como el daño orgánico y la gravedad de la pancreatitis (17, 19). Los niveles de IL-6, y en menor proporción los de IL-8, han mostrado correlación con la extensión del daño orgánico y la gravedad de la pancreatitis en humanos, por lo que en varios estudios se han propuesto como marcadores pronósticos de la

enfermedad (5, 7-10, 20, 21), aunque esto no ha sido universalmente aceptado. La elevación de la IL-6 precede en general la de reactantes de fase aguda como la PCR, por lo que se considera que esta IL estimula su liberación (8-10, 18). No existe acuerdo en relación al tiempo en que se presenta el pico máximo de elevación de IL-6, pero parece ser entre 24 y 48 hrs de inicio del cuadro, aunque en algunos estudios esto se ha presentado incluso hasta 3 días después (18). Por otro lado, no se ha establecido si esta elevación también se presenta en los casos con complicaciones locales.

El TNF- α es una de las citocinas más importantes ya que es la que inicia la cascada inflamatoria que se desencadena en procesos como la sepsis y la PA y juega un papel preponderante en el desarrollo de la falla orgánica de estos enfermos (10). Incrementa la permeabilidad de las células endoteliales, estimula la producción de radicales de oxígeno e induce la marginación, atracción y activación de neutrófilos que a su vez liberan otras IL (11,12). Se produce principalmente en monocitos y macrófagos activados, aunque se ha detectado su RNA-m en células acinares pancreáticas y en neumatocitos (22). En teoría estas características del TNF- α lo harían el marcador más precoz en la respuesta inflamatoria; sin embargo la medición de sus niveles séricos de ha sido de poca utilidad clínica, ya que en muchos casos, incluso aquellos con PAG éstos no son detectables (22-24). Esto puede ser debido a una vida media corta del TNF- α , a su unión con otras proteínas, al método de detección o al hecho que su liberación sanguínea sea intermitente (17, 22).

La PAP se produce en las células del páncreas, por lo que en teoría sería el marcador más específico de daño pancreático y el que se elevaría de manera más temprana, sin embargo, no hay estudios que analicen la elevación de esta proteína en relación al tiempo de evolución del cuadro, o al tipo de complicaciones, es decir pancreáticas o sistémicas, lo cual podría explicar en parte los resultados controversiales informados en la literatura.

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La PA es una condición clínica que se caracteriza por inflamación y necrosis del tejido pancreático y peripancreático; con una gama de presentación que varía desde una enfermedad con muy leves repercusiones locales y sistémicas en un extremo, hasta la necrosis y hemorragia pancreática y peripancreática con falla multiorgánica, sepsis y muerte en el otro. Se considera que del 20% al 30% de los casos son graves, con una mortalidad que se aproxima al 10% (1-3). En este sentido, uno de los aspectos principales en el manejo de la PA es el poder identificar de manera temprana aquel grupo de enfermos que van a presentar un episodio grave, que amerita ingreso a una unidad de terapia intensiva y tratamiento agresivo, que constituyen medidas que no están justificadas en pacientes con cuadros leves. Existen diversos criterios pronósticos de gravedad tanto clínicos como los criterios múltiples de Ranson o el APACHE II de reconocimiento universal (25) y los del Instituto Nacional de la Nutrición “Salvador Zubirán” (INNSZ) usados a nivel nacional (3); también hay criterios basados en cambios morfológicos de estudios de imagen como los de Balthazar (26) o en alteraciones bioquímicas en sangre periférica como PCr, IL-6 y PAP (27), entre otros. La utilidad clínica de poder predecir el pronóstico de la PA con sólo un examen de laboratorio tan sencillo es obvia, por lo que se ha tratado de mejorar los resultados obtenidos con la PCr, considerada hasta la actualidad como el estándar ideal de marcador serológico de gravedad, el cual ya ha sido establecido en un informe preliminar en nuestro Instituto (28).

JUSTIFICACION

La utilidad de los marcadores serológicos como PCr o PAP ha sido informada en múltiples estudios clínicos con resultados variables y en ocasiones controversiales. Existen pocos trabajos que comparen la utilidad de los marcadores en una misma población y que analicen las posibles causas de las diferencias observadas entre los resultados obtenidos.

En México no existe experiencia en relación a la aplicación de marcadores serológicos como PCr, IL-6 y PAP en enfermos con PAG. La utilidad clínica de éstos puede variar de acuerdo al tiempo de evolución del cuadro, por lo que se hace necesario hacer el análisis temporal de los mismos para poder adaptar los resultados a la población estudiada. Los trabajos realizados muestran, por ejemplo, que la producción de IL-6 se incrementa de manera importante el primer día de inicio del cuadro y disminuye 3 a 4 días después. En cambio, la PCr se incrementa hasta dos días después del inicio de la PA. No se ha establecido el tiempo de mayor elevación de la PAP, además de existir poca consistencia en los resultados, a pesar de ser un marcador más específico de daño pancreático. En la práctica clínica, aunque es infrecuente atender al enfermo justo al inicio de un dolor abdominal, se torna fundamental conocer cuál es el mejor marcador serológico al momento del ingreso al hospital que con mayor oportunidad y especificidad nos permita identificar a los casos graves.

OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS

GENERAL:

- De las determinaciones séricas de IL-6, PCr y PAP, identificar al mejor marcador pronóstico de gravedad en pacientes que ingresan al IINISZ con PA.

ESPECIFICOS:

- Establecer la sensibilidad, especificidad y razón de probabilidades de las determinaciones de IL-6, PCr y PAP para predecir el riesgo de desarrollar PAG.
- Analizar las diferencias en la utilidad de los marcadores de inflamación (IL-6, PCr y PAP) de acuerdo al tiempo de evolución de la pancreatitis
- Determinar si hay diferencia en los niveles de IL-6, PCr y PAP entre enfermos con complicaciones locales y aquellos con complicaciones sistémicas de PA.

HIPOTESIS

- Al ingreso al hospital, los niveles séricos de IL-6, PCr y PAP se encuentran significativamente más elevados en enfermos con PA que evolucionarán a al gravedad que en los que persisten como casos leves.
- Las diferencias en la utilidad clínica (sensibilidad, especificidad y razón de probabilidades) de éstos marcadores séricos, para establecer el pronóstico de gravedad en nuestra población de enfermos al ingresar al hospital, es dependiente del tiempo de evolución de la PA.
- Los niveles de los marcadores estudiados son mayores cuando se desarrollan complicaciones sistémicas que en aquellos que desarrollan complicaciones locales. La diferencia en los niveles de estos marcadores entre los casos complicados y los no complicados es mayor cuando se consideran sólo complicaciones sistémicas.

MATERIAL Y METODOS

SEDE

El estudio se realizó en el INNSZ, que es un hospital de tercer nivel de la Secretaría de Salud y por lo tanto un centro de concentración de enfermos con PA.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Es un estudio observacional, comparativo y longitudinal prospectivo en el cual se analizaron pacientes que acudieron al hospital durante su primer cuadro de PA de menos de una semana de evolución. Para hacer las mediciones de PCr, IL-6 y PAP se les tomó una alícuota de suero proveniente de la muestra de sangre que se obtuvo al ingreso al hospital (primeras 24 h de hospitalización).

Durante la evolución de los enfermos se recabó información acerca de datos generales (nombre, registro, sexo, edad); criterios pronósticos de Ranson; etiología; desarrollo de complicaciones locales (necrosis, absceso, pseudoquiste, colecciones) y/o sistémicas, a saber: falla renal, respiratoria o multiorgánica, choque y/o sepsis (de acuerdo a los criterios de Atlanta y de APACHE II) (29, 30); estancia intrahospitalaria y en la Unidad de Terapia Intensiva (UTI); tratamiento y evolución.

Se analizaron los niveles de PCr, IL-6 y PAP y se compararon en grupos de enfermos de acuerdo a la presencia o no de criterios de mal pronóstico y en aquellos con y sin desarrollo de complicaciones tanto locales como sistémicas, buscando diferencias en su utilidad de acuerdo al tipo de complicación. También se analizaron las diferencias entre aquellos con pancreatitis leve vs grave de acuerdo a la definición establecida más adelante en las variables primarias. Los resultados se expresan en medianas para cada uno de los marcadores. La comparación se realizó mediante U

de Mann-Whitney. Se calcularon sensibilidad y especificidad y de acuerdo a la razón de probabilidades positiva (sensibilidad/(1-especificidad))se seleccionaron los límites de corte. Según este último valor y considerando la probabilidad pre-prueba de 30% de acuerdo a la prevalencia encontrada en nuestra población (31), se obtuvo la probabilidad post-prueba para predecir gravedad siguiendo el nomograma de la figura 1 (32). Asimismo, se calcularon las razones de riesgos. Se calcularon los intervalos de confianza al 95% para todos estos parámetros. Se realizaron curvas ROC (Receiver Operator Characteristics) para buscar el mejor nivel de corte para cada uno de los marcadores de acuerdo al tiempo de evolución del cuadro. Una vez establecidos los niveles de corte, se analizó mediante Chi cuadrada las diferencias entre los grupos definidos. Se consideró significativa una $p < 0.05$.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes con diagnóstico de pancreatitis aguda sustentado por: a) cuadro clínico compatible con elevación sérica de amilasa o lipasa cuando menos 5 veces los valores de referencia, b) hallazgos compatibles con el diagnóstico en ultrasonido abdominal o tomografía axial computarizada de abdomen o c) evidencia de pancreatitis durante laparotomía.o autopsia.
- Pacientes con su primer episodio de pancreatitis aguda.
- Consentimiento verbal para la utilización de sangre tomada al ingreso al hospital.

CRITERIOS DE EXCLUSION

- Haber ingresado por complicaciones tardías de la pancreatitis.

- Tener más de una semana de evolución del dolor.
- Cursar con patologías con inmunocompromiso como SIDA, diabetes, neoplasias, inmunodeficiencias primarias, etc.
- Tomar fármacos inmunosupresores.
- No haberse tomado sangre en las primeras 24 horas de hospitalización.

VARIABLES

A. PRIMARIAS

1. PCR: Se midió en suero mediante nefelometría (Beckman, Munich, Alemania) por el laboratorio de rutina del INNSZ.
2. INTERLEUCINA 6: Se midió en suero utilizando un equipo comercial Human IL-6, Quantitative ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA (Anexo 1).
3. PAP: Se midió en suero mediante ELISA, utilizando un equipo comercial del laboratorio Dynabio, Francia (Anexo 2).
4. PANCREATITIS AGUDA GRAVE: Se consideró grave cuando la PA se acompañó del desarrollo de complicaciones locales (necrosis, necrosis infectada, pseudoquiste, absceso) y/o sistémicas (falla renal, cardiovascular, respiratoria, multiorgánica, sepsis, hemorragia de tubo digestivo) (29, 30)

5. PANCREATITIS AGUDA LEVE: Se consideró leve cuando la PA no se asoció al desarrollo de complicaciones locales ni sistémicas.

B. SECUNDARIAS

1. CRITERIOS DE MAL PRONOSTICO DE GRAVEDAD AL INGRESO: Se consideraron positivos cuando se presentaron 3 o más criterios de Ranson en las valoraciones de 24 y 48 horas.
2. NECROSIS: Se consideró necrosis pancreática a zonas de hipoperfusión demostradas por tomografía dinámica, o cuando se tuvo evidencia morfológica de la misma, p. ej. por cirugía o necropsia.
3. PSEUDOQUISTE: Se consideró pseudoquiste a toda colección de jugo pancreático, circunscrito por una pared fibrosa o de tejido de granulación, demostrada por ultrasonido o tomografía.
4. ABSCESO PANCREATICO: Se consideró absceso a toda colección de pus bien delimitada que se presentó en la proximidad del páncreas, demostrada por estudios de imagen, punción o cirugía.
5. FALLA RENAL: Se consideró en falla renal a todo paciente que presentó elevación de la creatinina sérica mayor a 3.5 mg/dl, volumen urinario ≤ 479 ml/día o ≤ 159 ml/8h, ó elevación del BUN ≥ 100 mg/100 ml.

6. CHOQUE O FALLA CARDIOVASCULAR: Se consideró en choque a todo paciente que durante su evolución presentó frecuencia cardíaca $\leq 54/\text{min}$, presión arterial media ≤ 49 mmHg, desarrollo de taquicardia o fibrilación ventricular o con pH sérico ≤ 7.24 con $\text{PaCO}_2 \leq 40$ mmHg.
7. FALLA RESPIRATORIA: Se consideró en falla respiratoria a todo paciente que presentó frecuencia respiratoria $\leq 5/\text{min}$ o $\geq 49/\text{min}$, $\text{Paco}_2 \geq 50$ mmHg o que se encontró dependiente de ventilador o con presión positiva continua de la vía aérea.
8. FALLA MULTIORGANICA: Se consideró en falla multiorgánica a todo paciente que presentó al menos falla de dos sistemas por un período de 24 hrs o más.
9. SEPSIS: Se consideró en sepsis a todo paciente que presentó evidencia clínica de infección, en conjunto con taquicardia, taquipnea y alteraciones de la termoregulación.
10. HEMORRAGIA DE TUBO DIGESTIVO: Se consideró cuando la hemorragia fue de más de 500 ml en 24 horas.
11. INGRESO A TERAPIA INTENSIVA: Esta variable se consideró positiva cuando el paciente ingresó a la UTI por criterios de mal pronóstico o desarrollo de complicaciones.

RESULTADOS

CARACTERISTICAS GENERALES

Demografía

La población estudiada consistió en 72 enfermos con PA. De éstos, 37 (51.3%) pertenecían al género masculino y 35 (48.6%) al femenino. El promedio de edad del grupo estudiado fue de 45.6 ± 17 años, con un rango de 16 a 85 años.

Etiología

Las etiologías de PA más frecuentes fueron: biliar (n=31), post-colangiografía endoscópica (n=10), alcohólica (n=9), idiopática (n=9), hipertrigliceridemia (n=7), drogas (n=3), trauma (n=1), post-quirúrgica (n=1) e hipercalcemia (n=1).

Criterios de mal pronóstico

Veintitrés pacientes presentaron criterios de mal pronóstico (Ranson) al ingreso al hospital. Doce de éstos desarrollaron PAG. La sensibilidad de estos criterios en el grupo estudiado fue de 52% con especificidad de 82% y razón de probabilidades de 2.8., lo que incrementó poco (55%) la probabilidad de predecir gravedad.

Gravedad

En 14 pacientes (19.4%) se documentaron complicaciones locales (13 asociadas a complicaciones sistémicas y 1 sólo local) y en 20 (28%) sistémicas (13 asociadas a locales y 7 sólo sistémicas) (tabla 1). En total veintiun pacientes (29%) desarrollaron PAG de acuerdo al desarrollo de complicaciones, uno de los cuales falleció por falla orgánica múltiple.

MARCADORES SEROLÓGICOS

Del total de pacientes estudiados se pudo obtener mediciones de IL-6 en 70, de PCr en 67 y de PAP en 57 enfermos. Se observó una gran dispersión de valores de los marcadores serológicos (figura 2) en enfermos con PA leves como graves, por lo que se decidió expresar los resultados como medianas y percentilas (figura 3). En la tabla 2 se anotan los niveles de corte seleccionados en base a las curvas ROC, así como la sensibilidad, especificidad y razón de probabilidades para cada marcador sérico independientemente tiempo de evolución de la PA.

- **Proteína C reactiva**

Los enfermos con criterios de mal pronóstico tuvieron valores de PCr mayores que aquellos sin criterios de mal pronóstico (10.7 vs 5.6 mg/mL, $p=0.04$). No se observó diferencia en los niveles de PCr entre los pacientes que se admitieron a la UTI y los que se manejaron en otros servicios ($p=0.2$). La PCr fue más alta en enfermos que desarrollaron PAG comparados a los que presentaron PA leve (14 vs 5.6 mg/mL, $p=0.004$) (figura 2). Los niveles de PCr estuvieron más elevados tanto en enfermos que desarrollaron complicaciones locales (21.4 vs 6.2 mg/mL, $p=0.004$) como complicaciones sistémicas (14 vs 5.6 mg/mL, $p=0.004$) (tabla 1).

- **Interleucina-6**

Los niveles séricos de IL-6 en enfermos con criterios de mal pronóstico fueron mayores que en aquellos sin criterios de mal pronóstico (127 vs 23.7 pg/mL, $p=0.0001$). Se observó que la IL-6 fue más alta en los casos que requirieron ingresarse a la UTI comparados con los que se manejaron en otros servicios hospitalarios (120 vs 38 pg/mL, respectivamente; $p=0.01$). Hubo diferencia estadísticamente significativa en niveles de IL-6 entre pacientes que desarrollaron PAG y PA leve (118 vs 29 pg/mL, $p=0.005$) (figura 2). Las diferencias en los niveles de IL-6 fueron más pronunciadas en los enfermos que desarrollaron complicaciones sistémicas (121 vs 29

pg/mL, $p=0.001$) en comparación a aquellos con complicaciones locales (119 vs 39 pg/mL, $p=0.06$) (tabla 1).

- **Proteína asociada a la pancreatitis**

Aunque los enfermos con criterios de mal pronóstico tuvieron mayores niveles de PAP en comparación a aquellos sin criterios de mal pronóstico, esto no mostró significancia estadística (280 vs 86 ng/mL, $p=0.1$). Tampoco se observó diferencia en los niveles de PAP entre los pacientes que se admitieron a la UTI y los que se manejaron en otros servicios ($p=0.9$). Sin embargo, los que desarrollaron PAG tuvieron valores mayores que aquellos que presentaron PA leve (300 vs 85 ng/mL, $p=0.04$) (figura 3). Las diferencias más aparentes en los niveles de PAP se observaron en pacientes que desarrollaron complicaciones sistémicas (292 vs 86 ng/mL, $p=0.06$) y no en aquellos con complicaciones locales (280 vs 139 ng/mL, $p=0.16$).

TIPO DE COMPLICACION (tabla 3)

El análisis de complicaciones individuales mostró que los niveles elevados de IL-6 y de PCR correlacionaron con el desarrollo de necrosis y casi todas las complicaciones sistémicas. El pseudoquiste fue la complicación que no mostró diferencias en los niveles de ningún marcador sérico, probablemente por no estar directamente relacionado con el fenómeno inflamatorio. La falla orgánica múltiple y el choque fueron las complicaciones que mostraron diferencias en los niveles de los tres marcadores de gravedad.

ANALISIS TEMPORAL

Para estudiar la utilidad de los marcadores serológicos en el diagnóstico de PAG al momento de ingreso al hospital se contruyeron curvas ROC para diferentes tiempos de evolución de la PA y de acuerdo a las áreas bajo estas curvas (ABC) se separó la muestra en dos grupos: Grupo 1, con 0-2 días de evolución de la PA y Grupo 2, con 3-7 días (tabla 4).

- **Grupo 1**

En este grupo se incluyeron 32 pacientes.

La PCr mostró un ABC de 0.63. El nivel de corte en este caso fue de 2.34 mg/dL, con sensibilidad y especificidad de 86% y 41% respectivamente y con una razón de probabilidades de 1.35, es decir que la prueba no incrementa la probabilidad de hacer el diagnóstico. Con este nivel de corte no hubo diferencia estadísticamente significativa para el diagnóstico de PA grave ($p=0.5$).

La IL-6 y la PAP mostraron ambas un ABC de 0.81.

Para la IL-6 el mejor nivel de corte fue de 308 pg/mL, con una sensibilidad y especificidad de 63% y 96%, respectivamente y una razón de probabilidades de 7.4, con lo que se incrementa hasta casi 80% la probabilidad de hacer el diagnóstico con un resultado positivo. Con este nivel de corte, se observó diferencia estadísticamente significativa entre pacientes con PA grave y leve ($p=0.008$).

Para la PAP el mejor nivel de corte fue de 244 ng/mL, con una sensibilidad y especificidad de 83% y 78% respectivamente, con una razón de probabilidades de 6 y una ganancia hasta el 70% de poder predecir gravedad. Con este nivel de corte, la PAP también fue útil para el diagnóstico de PAG ($p=0.05$).

- **Grupo 2**

En este grupo la PCr mostró un ABC de 0.79. El mejor nivel de corte fue de 16.6 mg/dL, el cual tuvo sensibilidad y especificidad de 73% y 82%, respectivamente y una razón de probabilidades de 4, lo que duplica la probabilidad de tener una PAG en los casos estudiados. Con este nivel de corte se observó diferencia estadísticamente significativa entre enfermos con PA grave y leve ($p=0.01$).

La IL-6 tuvo un ABC de 0.62 con 1.91 de razón de probabilidades y la PAP de 0.55 con 2 de razón de probabilidades, por lo que ninguna de éstas incrementa por arriba del 50% la probabilidad de predecir gravedad (tabla 4).

ANALISIS DE RIESGOS

Se observó un incremento significativo en el riesgo de desarrollar PAG cuando alguno de los marcadores que se identificaron previamente como útiles fue positivo (tabla 5).

DISCUSION

Uno de los retos más importantes que se presentan ante el clínico es el poder predecir la evolución de un paciente con PA cuando lo recibe en el hospital, ya que los casos graves ameritan un manejo agresivo y costoso que no se justifica en casos leves. Se han descrito múltiples sistemas pronósticos como los criterios de Ranson, Glasgow, INNSZ y los del APACHE-II, entre otros, los cuales tienen el inconveniente de requerir varias determinaciones de laboratorio o esperar hasta 48h para obtener una evaluación adecuada. Por esto se han buscado estudios de laboratorio en donde una sola determinación bioquímica puede ser usada como predictor de gravedad (27)

Desde el inicio de la década de los noventa se ha reconocido el papel que juegan las citocinas en la fisiopatología de la PA y de sus complicaciones. Experimentalmente, se sabe que treinta minutos después de iniciado el daño del páncreas se incrementan significativamente los niveles de interleucinas en tejido pancreático y horas después este incremento se encuentra en el suero (17). Se ha demostrado que a nivel periférico, tanto en pulmón como en bazo e hígado, también se estimula la producción de TNF- α e IL-1 en respuesta a las citocinas liberadas por el páncreas (22). Se ha demostrado que durante la sepsis grave, la IL-1 y el TNF- α son los responsables de la mayor parte del daño sistémico, fenómeno que ocurre también en PA. En este sentido, algunos estudios han demostrado que la producción de TNF- α en tejido pulmonar correlaciona con el daño a este nivel y con el desarrollo del síndrome de insuficiencia respiratoria progresiva del adulto (SIRPA), una de las complicaciones más temidas de los cuadros graves (33). La IL-1 y el TNF- α son las interleucinas que se han identificado como responsables de desencadenar o potenciar toda la cascada inflamatoria de la PA, por lo que se ha intentado medir sus niveles en plasma o suero como marcadores de mal pronóstico. Sin embargo, los

resultados han sido controversiales, probablemente porque su liberación a la sangre periférica es intermitente y de corta duración (17, 22). Se han medido entonces otras citocinas como IL-6 e IL-8, demostrándose en varios estudios que sus niveles séricos correlacionan con la gravedad de la PA (7-10, 17, 27). Una de las acciones conocidas de la IL-6 es la de estimular la producción de reactantes de fase aguda como sería la PCR en el hígado, cuyos niveles se han utilizado como marcador pronóstico de la enfermedad, siendo uno de los más aceptados y considerado como estándar ideal para PAG (6, 34). Sin embargo, la producción de esta cascada inflamatoria es un fenómeno que no es específico del páncreas, por lo que algunos investigadores han propuesto el uso de otros marcadores serológicos más específicos de daño tisular como la PAP, originada en el páncreas y cuya producción correlaciona con la gravedad de la PA (13).

Pudimos obtener los criterios de Ranson en todos nuestros pacientes, observando que los enfermos que tenían tres o más de éstos presentaban niveles de PCR e IL-6 significativamente mayores, lo que no se observó en el caso de la PAP. Lo anterior concuerda con el hallazgo de niveles significativamente más altos de PCR e IL-6 que de PAP en los casos con evolución tórpida (tabla 2). En la población estudiada encontramos que 30% de los enfermos desarrollaron alguna complicación y por lo tanto corresponde a la prevalencia de gravedad definida de acuerdo a los criterios de Atlanta (29). Esta prevalencia concuerda con lo observado en estudios previos de enfermos similares, es decir, admitidos en forma directa en nuestro Instituto, por lo que la probabilidad de predecir PAG (30%) usada para obtener la probabilidad post-prueba es la adecuada para nuestra población.

La sensibilidad de los criterios de Ranson y su razón de probabilidades fueron similares a las de IL-6 y PAP y menores que las obtenidas para PCR, independientemente del tiempo de evolución de la pancreatitis (tabla 2). La baja sensibilidad de los criterios pronósticos ha sido informada por otros autores (36) y es difícil optimizar sus resultados, sin embargo en relación con los marcadores analizados, al separar a los enfermos de acuerdo a la duración de los síntomas al ingreso, hay un evidente incremento en la probabilidad de predecir gravedad para las determinaciones de IL-6 y PAP en el grupo 1 y de PCR en el grupo 2. Estos hallazgos apoyan la

propuesta hecha por otros autores (17) de usar un marcador sérico como única y mejor alternativa a los criterios múltiples para predecir gravedad.

Los enfermos con PAG requieren generalmente del apoyo de servicios de terapia intensiva durante la evolución del cuadro, por lo que el ingreso a ésta puede ser un dato indirecto de gravedad que decidimos evaluar en este estudio. Los resultados obtenidos en los enfermos estudiados mostraron que aquellos que ingresaron a la UTI tuvieron niveles significativamente mayores de IL-6 que los que fueron atendidos en otros servicios clínicos. Esta observación además del hallazgo de niveles altos de IL-6 en los pacientes que presentaron predominantemente complicaciones sistémicas, que son las que requieren mayor vigilancia, permiten proponer a la IL-6 como el mejor indicador para iniciar un manejo agresivo de la PA a la admisión de los enfermos.

En este estudio encontramos que los niveles de los tres marcadores investigados, PCr, IL-6 y PAP, al momento de ingreso al hospital se encuentran significativamente más elevados en enfermos que desarrollaron PAG. Se observó una gran dispersión de valores que puede explicar la gran variabilidad en los resultados que se han informado en la literatura para cada una de estas pruebas. Por otro lado, también se observó variación en las diferencias de los resultados de las pruebas dependiente del tipo de complicaciones (tabla3).

El marcador más útil en el grupo estudiado, independientemente del tiempo de evolución del cuadro, fue la PCr (tabla 2) y tal como ha sido propuesto en otros estudios, podría ser utilizado como marcador único de gravedad en estos casos, sobre todo si no se dispone de otros estudios de apoyo. Es más, se ha informado que la PCr es un predictor útil para el diagnóstico de necrosis pancreática (6), lo que puede apoyarse con nuestros hallazgos de niveles significativamente más altos en presencia de esta complicación así como también en los casos de absceso (tabla 3). Es interesante mencionar que aún cuando en nuestros enfermos también se elevó la PCr en presencia de complicaciones sistémicas (insuficiencia respiratoria, choque, sepsis y falla orgánica múltiple), se pudo observar que las diferencias en sus niveles fueron mayores cuando los pacientes tuvieron complicaciones sistémicas asociadas a complicaciones locales, probablemente reflejando la presencia de necrosis y/o absceso (tabla 1).

La IL-6 mostró utilidad para predecir desarrollo de PAG (tablas 2, 4 y 5), sobre todo los valores más elevados se encontraron en pacientes con necrosis pancreática y con cualquiera de las complicaciones sistémicas (tablas 1 y 3). Esta mayor selectividad de la IL-6 para todas las complicaciones sistémicas comparada con los otros marcadores estudiados, puede deberse al papel de las citocinas en la cascada de respuesta inflamatoria generalizada cuando hay daño agudo del páncreas, independientemente del desarrollo de complicaciones locales.

La PAP fue la prueba con menor utilidad para predecir gravedad de PA al momento de ingreso al hospital en nuestra serie de enfermos. Lo anterior pudiera explicarse por que la PAP refleje el daño pancreático tisular, lo que no necesariamente correlacione con la gravedad de la PA, sin embargo esto no se apoya con los resultados de niveles de PAP en las complicaciones locales (necrosis, absceso, pseudoquiste) en donde no se elevó de manera significativa (tabla 3). En este estudio, se observó incremento significativo sólo en enfermos con choque y falla orgánica múltiple, por lo que su utilidad parece limitada al compararla con los otros marcadores. Los resultados con PAP han sido controversiales; los estudios de Iovanna y cols. (13) muestran niveles significativamente mayores en enfermos con PAG mientras que el estudio de Pezzilli y cols. (14) y el de Kempainen y cols. (15) no encuentran diferencia entre pacientes graves y leves. Además de las diferencias en las poblaciones estudiadas, pudieran existir diferencias en la metodología para la determinación de la PAP. En el primero utilizan un ELISA con anticuerpos dirigidos contra el péptido sintético N-terminal de la PAP, en cambio en los otros dos estudios y en el nuestro se utiliza un equipo comercial de ELISA que mide anticuerpos policlonales contra la PAP.

La variación y dispersión de los resultados obtenidos en los marcadores observadas en éste y otros estudios, se redujo cuando éstos se analizaron tomando en cuenta las observaciones hechas previamente en relación a la fisiopatología de la PA; es decir, al hacer el análisis en relación con el tiempo esperado en que estas proteínas alcanzan su pico máximo, como parte de la respuesta al daño pancreático. Lo esperado sería que la PAP, cuyo origen es en el páncreas, fuera la primera respuesta, seguida por mediadores de inflamación como citocinas producidas en tejido pancreático

pero que son a su vez inductoras de de mayor producción en otros órganos y condicionan la producción de reactantes de fase aguda como la PCr.

Es así que con base a curvas ROC hechas a diferentes tiempos de evolución de la PA, se identificaron los días y los niveles de corte que reflejan la mejor utilidad de los marcadores serológicos de acuerdo a las áreas bajo estas curvas. Conviene mencionar que los valores seleccionados (tabla 5) se encuentran dentro de los rangos descritos por otros autores (7, 25). La división de los casos se hizo en dos grupos: el primero (grupo 1) conformado por pacientes que acudieron al hospital en los primeros 2 días de iniciada la PA y el segundo (grupo 2) por pacientes que acudieron con más días de evolución. Pudimos observar que en el grupo 1 tanto la IL-6 como la PAP fueron los estudios más útiles para predecir gravedad y en cambio la PCr mostró utilidad marginal, observándose un nivel de corte muy bajo (tabla 4). La diferencia en los niveles de IL-6 entre los casos graves y leves fue más significativa que para PAP, encontrándose que el incremento en la probabilidad de predecir gravedad también fue mayor para IL-6 que llega al 80% y que es más representativa de la utilidad de la prueba, cuya sensibilidad del 63% que interpretada aisladamente podría descalificarla. Por otro lado, el riesgo de desarrollar PAG en los casos con IL-6 ≥ 308 pg/mL fue de 6, ligeramente menor que con la PAP pero también con mejor intervalo de confianza (tabla 5). Estas ventajas, así como que la determinación de IL-6 es una prueba de laboratorio como mayor aplicación en otras patologías, a diferencia de la PAP o incluso del péptido activador del tripsinógeno y el de carboxipeptidasa-B (27), otros marcadores serológicos de gravedad que se han descrito como útiles durante los primeros días de evolución de la PA, nos hace recomendarla como el marcador a utilizar en los casos de pancreatitis identificados en forma temprana, tales como aquellos secundarios a colangiopancreatografía endoscópica (37) en los que se han llegado a encontrar altas tasas de mortalidad (35) y que en nuestro medio fue el segundo factor etiológico de la PA.

De acuerdo a informes previos (8) y dado que la producción de PCr ocurre después del inicio de la cascada inflamatoria, es esperado que su medición sea más útil en el grupo de enfermos que acudieron al hospital después del tercer día de iniciada la PA, duplicando la

probabilidad de predecir un cuadro grave (60%) y asociándose a un riesgo relativo 5 veces mayor cuando los niveles se encuentran por arriba de 16.6 mg/dL. Las condiciones en las que se aplicaría esta prueba corresponden a la mayor parte de nuestros enfermos y es en ésta población en la que creemos debería ser realizada de rutina, o bien cuando no es posible establecer la duración de la PA o solo se puede contar con una prueba, ya que además de ser en la actualidad la más accesible en nuestro medio es la que presentó la mejor utilidad en forma global (tabla 2).

Dado que la muestra estudiada fue de 72 enfermos no se pudo realizar un mayor análisis en busca de otras diferencias entre los niveles de marcadores de gravedad, como serían los factores etiológicos o la obesidad. En un estudio previo encontramos que la etiología biliar o alcohólica se puede asociar a cuadros graves pero sólo en pacientes obesos (con índice de masa corporal ≥ 25 Kg/m²) (38). Se sabe que la respuesta inmune se encuentra alterada en pacientes obesos y por lo tanto ser una condición que contribuya al desarrollo de complicaciones. Además, algunos estudios (7) han encontrado que los niveles de linfocitos CD4 se encuentran disminuidos en pacientes con PA, lo que correlaciona con los niveles de IL-6, aunque aún existen controversias al respecto.

Es de esperar mayor mortalidad en los casos de enfermos con PAG por lo que llama la atención que solo un paciente del estudio haya fallecido. Se puede observar que a pesar de mantenerse sin cambio la prevalencia de gravedad en nuestros enfermos con PA, la mortalidad de las series de casos informados se han ido reduciendo (3, 38, 39). Uno de los factores que puede influir en la baja mortalidad, además de la mejor y más temprana identificación y manejo de los casos graves, es la selección de pacientes en su primer episodio de PA y que no hubieran recibido tratamiento en otros hospitales, lo que ha sido previamente informado en otras series de pacientes (35)

CONCLUSIONES

1. La utilidad de los marcadores de gravedad (PCr, IL-6 y PAP) es mayor cuando se analiza en grupos de enfermos de acuerdo al tiempo de evolución de la PA.
2. En forma global, es decir, independientemente del tiempo de evolución del cuadro, la PCr es el mejor predictor de gravedad, sobre todo en presencia de complicaciones locales.
3. Los niveles séricos de IL-6 pueden ser utilizados como marcadores de gravedad en PA asociada al desarrollo de complicaciones sistémicas
4. La sensibilidad, especificidad y la razón de probabilidades de la IL-6 y PAP en pacientes con ≤ 2 días de evolución y de la PCr en pacientes con ≥ 3 días de evolución fueron mejores que las de los criterios de Ranson, por lo que en nuestra población pudieran ser una mejor alternativa como predictores de gravedad.
5. Restringir la predicción de gravedad al resultado de un sólo estudio de laboratorio accesible tiene ventajas, sobre todo en hospitales con recursos limitados. Por lo tanto, en base a nuestros resultados creemos que en nuestra población debería de implementarse la medición de estos marcadores, adaptados al tiempo de evolución de la PA, como predictores únicos de gravedad.

BIBLIOGRAFIA

1. Steinberg W, Tenner S. Acute pancreatitis. *New Eng J Med* 1994; 330: 1198-210.
2. Williamson RCN. Early assessment of severity in acute pancreatitis. *Gut* 1984; 25: 1331-9.
3. Uscanga LF, Herrera E, Enríquez JR, Vargas F, Robles G. La identificación del enfermo con pancreatitis aguda grave. Un estudio prospectivo, comparativo entre los criterios de Ranson y los del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán". *Gac Méd Méx* 1998; 138: 283-7.
4. Blamey SL et al. Prognostic factors in acute pancreatitis. *Gut* 1984; 25: 1340-6.
5. Kusske AM, Rongione AJ, Reber HA. Cytokines and acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1996; 110: 639-42.
6. Insenmann R, Büchler M, Uhl W, et al. Pancreatic necrosis: an early finding in severe acute pancreatitis. *Pancreas* 1993; 8: 358-61.
7. Scholmerich J. Interleukins in acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31 Suppl 219: 37-42.
8. Leser HG, Gross V, Scheibenbogen C, et al. Elevation of interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1991; 101: 782-5.

9. Inagakı T, Hoshino M, Hayakawa T, et al. Interleukin-6 is a useful marker for early prediction of the severity of acute pancreatitis. *Pancreas* 1997; 14: 1-8.
10. Viedma JA, Perez-Mateo M, Domínguez J, Carballo F. Role of interleukin-6 in acute pancreatitis. Comparison with C-reactive protein and phospholipase A. *Gut* 1992; 33: 1264-7.
11. Keim V, Iovanna JL, Dagorn JCh. The acute phase reaction of the exocrine pancreas. Gene expression and synthesis of Pancreatitis-Associated-Proteins. *Digestion* 1994; 55: 65-72.
12. Orelle B, Keim V, Masciotra L, Dagorn JC, Iovanna JL. Human pancreatitis-associated protein (PAP-H). Cloning and expression of its mRNA in pancreatic inflammatory disease. *J Clin Invest* 1992; 90: 2284-91.
13. Iovanna JL, Keim V, Nordback I, et al. Serum levels of Pancreatitis-Associated-Protein as indicators of the course of acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1994; 106: 728-34.
14. Pezzilli R, Billi P, Migliori M, Gullo L. Clinical value of Pancreatitis-Associated-Protein in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1887-91.
15. Kemppainen E, Sand J, Poulakkainen P, et al. Pancreatitis associated protein as an early marker of acute pancreatitis. *Gut* 1996; 39: 675-8.
16. Van-Laethem JL, Marchant A, Delvaux A, et al. Interleukin 10 prevents necrosis in murine experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1995; 108: 1917-22.

17. Norman JG. Cytokine mediators of acute pancreatitis: potential new targets for pharmacologic therapy. En: Controversies and clinical challenges in pancreatic diseases, AGA postgraduate course (syllabus); 1998: 25-8.
18. McKay C, Imrie CW, Baxter JN. Mononuclear phagocyte activation and acute pancreatitis. Scand J Gastroenterol 1996; 31 Suppl 219: 32-6.
19. Norman J, Franz M, Messina J, et al. Interleukin-1-receptor antagonist decreases severity of experimental acute pancreatitis. Surgery 1995; 117: 648-55.
20. Heath DI, Cruickshank A, Gudeon M, et al. Role of interleukin-6 in mediating the acute phase protein response and potential as an early means of severity assessment in acute pancreatitis. Gut 1993; 34: 41-5.
21. de Beaux AC, Goldie AS, Ross JA, Carter DC, Fearon KC. Serum concentrations of inflammatory mediators related to organ failure in patients with acute pancreatitis. Br J Surg 1996; 83: 349-53.
22. De Beaux AC, Fearon KCH. Circulating endotoxin, tumor necrosis factor- α , and their natural antagonists in the pathophysiology of acute pancreatitis. Scand J Gastroenterol 1996; 31 Suppl 219: 43-6.
23. McKay C, Imrie CW, Baxter JN. Mononuclear phagocyte activation and acute pancreatitis. Scand J Gastroenterol 1996; 31 Suppl 219: 32-6.

24. Kaufmann P, Tilz GP, Lueger A, Demel U. Elevated plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptor (sTNFRp60) reflect severity of acute pancreatitis. *Intensive Care Med* 1997; 23: 841-8.
25. Imne CW. Acute pancreatitis stratifying severity- how, and does it make a difference?. En: *Controversies and clinical challenges in pancreatic diseases, AGA postgraduate course (syllabus)*; 1998: 55-9.
26. Balthazar EJ, Robinson DL, Megibow AJ, Ranson JH. Acute pancreatitis: value of CT in establishing prognosis. *Radiology* 1990; 174: 331-6.
27. Larvin M. Circulating mediators in acute pancreatitis as predictors of severity. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31 Suppl 219: 16-9.
28. Elizondo C, Uscanga L, Galván E, et al. Los niveles séricos de la proteína C reactiva tienen la misma sensibilidad y especificidad que los criterios múltiples de pronóstico en la identificación de enfermos con pancreatitis aguda grave (PAG). *Rev Gastroenterol Méx* 1992; 57: 270.
29. Bradley EL. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on acute pancreatitis, Atlanta, Sept. 11-13, 1992. *Arch Surg* 1993; 128: 586-90.
30. Matushak GM. Multiple systems organ failure: clinical expression, pathogenesis and therapy. En: Hall JB, Schmidt GA, Wood LDH: *Principles of critical care*, McGraw Hill, New York, 1992.

31. Sackett D, Starus S. On some clinically useful measures of the accuracy of diagnostic tests. *ACP Journal Club* 1998; Editorial: A17-9.
32. Fagan TJ. Nomogram for Bayes's theorem. *N Engl J Med* 1975; 293: 257.
33. Formela LJ, Galloway SW, Kingsnorth AN. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *Br J Surg* 1995; 82: 6-13.
34. Domínguez Muñoz JE, Malfertheiner P. Management of severe acute pancreatitis. *Gastroenterologist* 1993; 1(4): 248-56.
35. de Beaux AC, Palmer KR, Carter DC. Factors influencing morbidity and mortality in acute pancreatitis; an analysis of 279 cases. *Gut* 1995; 37: 121-6.
36. Corfield AP, Cooper MJ, Williamson RCN. Prediction of severity in acute pancreatitis: a prospective comparison of three prognostic indices. *Lancet* 1985; 11: 403-6.
37. Oezcueruemez-Porsh M, Kunz D, Hardt PD, et al. Diagnostic relevance of interleukin pattern, acute-phase proteins, and procalcitonin in early phase of post-ERCP pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 1763-9.
38. Suazo-Barahona J, Carmona-Sánchez R, Robles-Díaz G, et al. Obesity a risk factor for severe acute biliary and alcoholic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(8): 1324-8.
39. Uscanga L, Enriquez JL, Vargas F, Robles-Díaz G, Campuzano M. Criterios pronósticos en pancreatitis aguda. Una alternativa útil y aplicable en nuestro medio. *Rev Gastroenterol Mex* 1988; 53: 67-72.

Figura 1. Nomograma del teorema de Bayes's

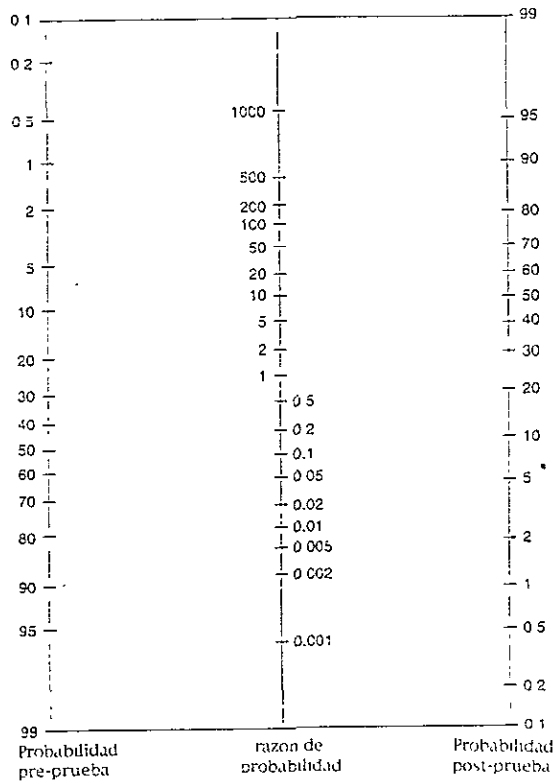
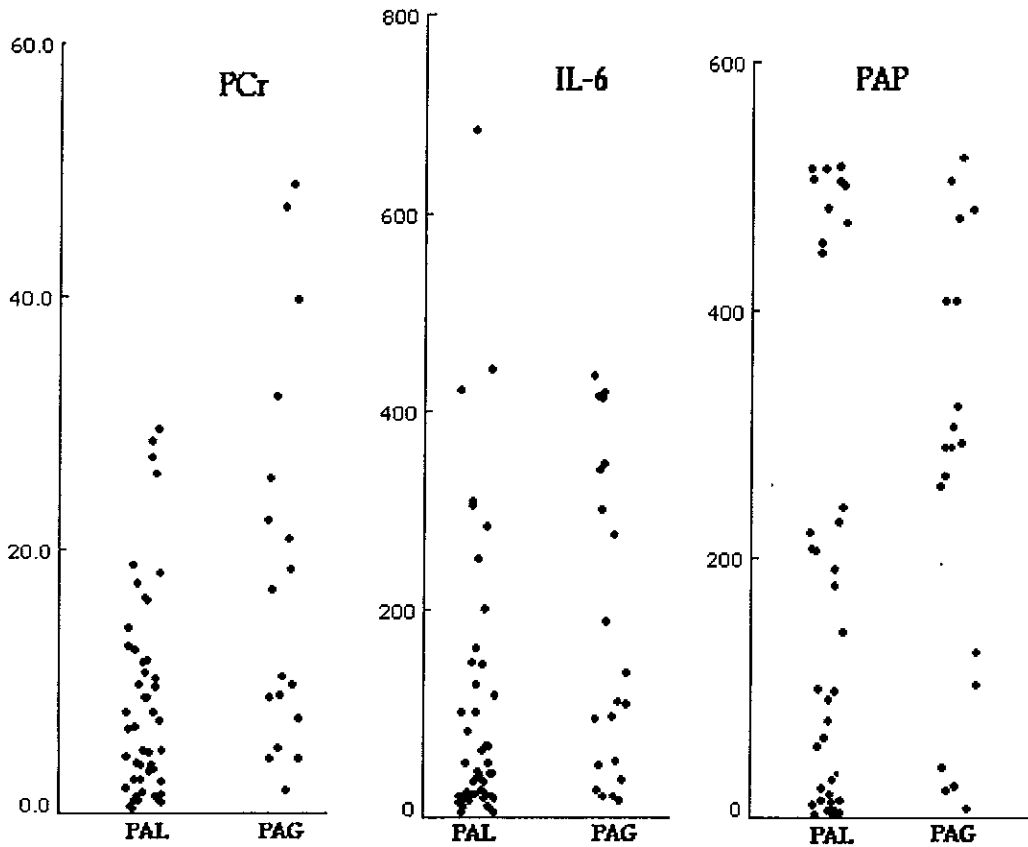


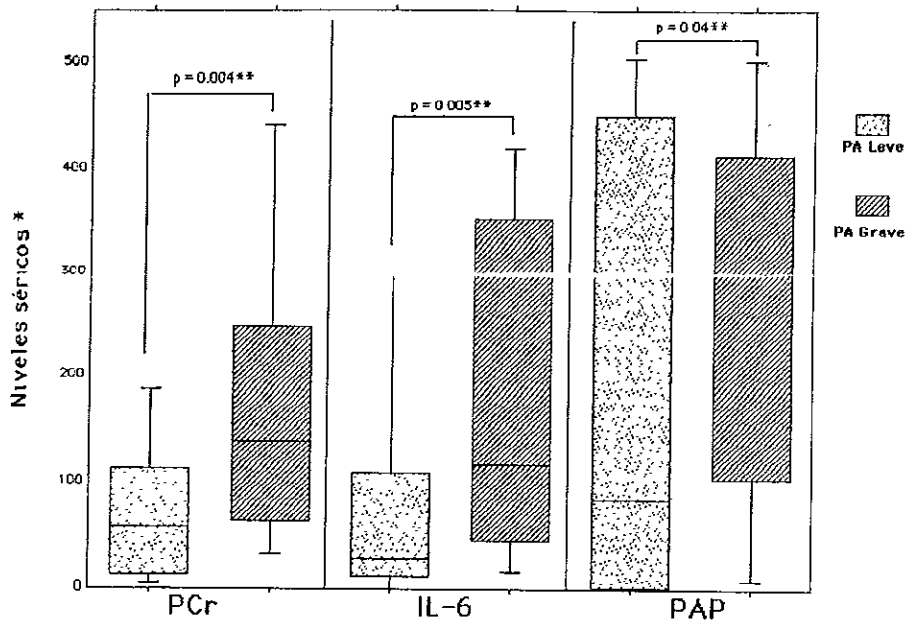
Figura 2. Niveles séricos de marcadores de gravedad en PA



PAL= Pancreatitis aguda leve PAG= Pancreatitis aguda grave

PCr= mg/dL IL-6= pg/mL PAP= ng/mL

Figura 3. Niveles de marcadores de gravedad en pacientes con PA grave y leve



* PCr= mg/dL X 10

IL-6= pg/mL

PAP= ng/mL

** U de Mann-Whitney

En esta figura se pueden observar las medianas, intercuartiles y rangos de los niveles de los marcadores en pacientes con PA leve y grave.

Tabla 1. Niveles de PCr, IL-6 y PAP de acuerdo al desarrollo de complicaciones locales o sistémicas.

Complicaciones	PCr		IL-6		PAP	
	n	Mediana	n	Mediana	n	Mediana
Locales Total	11	21.4	14	119	14	280
Con sistémicas	11	21.4	13	125	13	261
Sin sistémicas	0	0	1	9.2	1	300
Sin complicaciones locales	56	6.2	56	39	43	139
Sistémicas total	18	14	20	121	18	292
Con locales	11	21.4	13	125	13	261
Sin locales	7	8.6	7	118	5	300
Sin complicaciones sistémicas	49	5.6	50	29	39	86

**Tabla 2. Utilidad de marcadores serológicos de gravedad de PA
independientemente de la evolución del cuadro**

Marcador	Nivel de corte	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	RP
PCR	17.3 mg/dL	50	88	4
IL-6	89.6 pg/mL	67	71	2.4
PAP	244 ng/mL	68	74	2.6

RP= Razón de probabilidades

Tabla 3. Niveles de marcadores serológicos de gravedad en PA según tipo de complicación

Complicación	PCr (mg/dL)			IL-6 (pg/mL)			PAP (ng/mL)		
	n	Mediana	p	n	Mediana	p	n	Mediana	p
Necrosis	+	8	21.4	8	244		8	280	
	-	59	6.2	62	38	0.003	49	139	0.3
Absceso	+	6	20	9	44.6		9	300	
	-	61	6.6	61	46.3	0.7	48	156	0.1
Seudoquistes	+	2	24	3	113		5	300	
	-	65	7	67	44.6	0.6	54	156	0.2
Falla renal	+	2	5.4	2	427		2	406	
	-	65	8	68	43	0.02	55	173	0.1
Falla resp.	+	12	20	14	44.6		13	300	
	-	55	6	56	37.8	0.01	44	112	0.07
Choque	+	14	14.5	15	125		13	300	
	-	53	6	55	29.4	0.002	44	85	0.02
F.O.M.	+	11	21.4	12	205		11	300	
	-	56	6.2	58	38	0.007	46	112	0.04
Sepsis	+	10	21.4	11	125		11	259	
	-	57	6.1	59	39	0.04	46	180	0.5

Falla resp.= Falla respiratoria

F.O.M.: Falla orgánica múltiple

Tabla 4. Utilidad de marcadores serológicos de gravedad de PA de acuerdo al tiempo de evolución del cuadro

	Nivel de corte	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	p
<u>Grupo 1</u>				
PCR	2.34 mg/dL	86	41	0.5
IL-6	308 pg/mL	63	96	0.008
PAP	244 ng/mL	83	78	0.05
<u>Grupo 2</u>				
PCR	16.6 mg/dL	73	82	0.01
IL-6	89.7 pg/mL	67	65	0.15
PAP	228 ng/mL	61	70	0.26

Tabla 5. Riesgo de presentar PA grave de acuerdo al resultado de marcadores serológicos

	PA GRAVE n	PA LEVE n	RIESGORELATIVO	IC 95%
<u>GRUPO 1 (< 2 días)</u>				
IL-6 (nivel de corte)				
>308 pg/mL	5	2		
≤308 pg/mL	3	21	6	1.9 – 17
PAP (nivel de corte)				
>244 ng/mL	5	5		
≤244 ng/mL	1	13	7	1.4 – 34
<u>GRUPO 2 (≥ 3 días)</u>				
PCr (nivel de corte)				
>16.6 mg/mL	8	5		
≤16.6 mg/mL	3	22	5	1.9 - 14

IC 95%= Intervalos de confianza al 95%

A N E X O S

human
IL-6

Quantikine™

Human IL-6 Immunoassay

Catalog Number D6050

For the quantitative determination of human interleukin 6 (IL-6) concentrations in cell culture supernate, serum, and plasma.

**FOR RESEARCH USE ONLY.
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.**

TABLE OF CONTENTS

Contents	Page
INTRODUCTION	2
PRINCIPLE OF THE ASSAY	3
LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	4
REAGENTS	4
STORAGE	5
OTHER SUPPLIES REQUIRED	5
PRECAUTIONS	5
SAMPLE COLLECTION AND STORAGE	6
REAGENT PREPARATION	7
ASSAY PROCEDURE	7
ASSAY PROCEDURE SUMMARY	8
CALCULATION OF RESULTS	9
TECHNICAL HINTS	10
PERFORMANCE CHARACTERISTICS	10
RECOVERY	11
LINEARITY	11
SENSITIVITY	12
CALIBRATION	13
EXPECTED VALUES	13
SPECIFICITY	14
REFERENCES	15

MANUFACTURED AND DISTRIBUTED BY:

R&D Systems, Inc. (800) 343-7475
 614 McKinley Place N.E. (612) 379-2956
 Minneapolis, MN 55413 (612) 379-6580
 United States of America info@rndsyste.ms.com

DISTRIBUTED BY:

R&D Systems Europe
 4 - 10 The Quadrant
 Barton Lane
 Abingdon, Oxon OX14 3YS
 United Kingdom
 R&D Systems GmbH
 Borsgraben 7
 65205 Wiesbaden-Nordenstadt
 Germany
 Funakoshi Co., Ltd.
 I.P.O. Box 5262
 Tokyo
 Japan

TELEPHONE: (01235 551100)
 FAX: (01235 533420)
 E-MAIL: info@rndsyste.ms.co.uk

FREEPHONE: 0130 11 0169
 TELEPHONE: 06122 90980
 FAX: 06122 909819

TELEPHONE: 03-5684-1622
 FAX: 03-5684-1633
 E-MAIL: tuna@gol.com
 URL: http://www.funakoshi.co.jp

INTRODUCTION

Interleukin 6 (IL 6) is a multi-functional protein produced by lymphoid and non-lymphoid cells, and by normal and transformed cell, including T cells, monocyte/macrophages, fibroblasts, hepatocytes, vascular endothelial cells, cardiac myocytes, bladder cell carcinoma lines, myelomas, astrocytes, and glioblastomas. The production of IL 6 in these various cells is regulated either positively or negatively by a variety of signals including mitogens, antigenic stimulation, lipopolysaccharides, IL-1, TNF, PDGF, and viruses. On the basis of its various activities, IL 6 has also been called interferon $\beta 2$ (IFN $\beta 2$), 26 kDa protein, B cell stimulatory factor 2 (BSF-2), hybridoma/plasma-cytoma growth factor, hepatocellular stimulating factor, cytotoxic T cell differentiation factor, and macrophage-granulocyte inducing factor 2¹ (MGI-2A). For reviews on IL-6, see references 1-5.

The human IL-6 cDNA sequence predicts a protein of 212 amino acid residues in length with two potential N-glycosylation sites. The hydrophobic N terminal 28 amino acid residue signal peptide is cleaved to produce a mature protein of 184 amino acids with four cysteine residues and a predicted molecular mass of 21 kDa (6-9). Mouse IL-6 cDNA sequence shows a homology of 42% at the amino acid level when compared with the human sequence (10). Sequencing of the genomic DNA for IL-6 indicates that the gene for this factor consists of five exons and four introns. On the basis of sequence similarity and gene structural motif similarity, IL-6 can be grouped in a family of cytokines that also includes OSM, G-CSF, LIF, and CNTF. All of these cytokines are predicted to have a four helix bundle structure similar to that found for growth hormone, suggesting that they all evolved from a common ancestral gene (11, 18, 39).

The effects of IL 6 on different cells are numerous and varied. The effect on B cells is stimulation of differentiation and antibody secretion (6, 12-15). IL-6 also affects T cells, acting as a co-stimulant with sub-optimal concentrations of PHA or Con A to stimulate IL-2 production and IL-2 receptor expression. IL-6 exhibits growth factor activity for mature thymic or peripheral T-cells, and reportedly enhances the differentiation of cytotoxic T-cells in the presence of IL-2 or IFN- γ (16-18). IL stimulates production of acute phase proteins by hepatocytes (19) and has colony-stimulating activity on hematopoietic stem cells (20, 21). IL-6 has growth factor activities and will stimulate the growth of myeloma/hybridoma/plasmacytoma cells (22, 23), EBV-transformed B cells (24), keratinocytes and mesangial cells (4, 5). Additional bio-activities attributed to IL-6 include inhibition of the growth and induction of terminal differentiation of M1 myeloid leukemic cells (25), induction of neuronal cell differentiation (26, 27), induction of the maturation of megakaryocytes (28). Although IL 6 was also discovered as an antiviral activity produced by human diploid fibroblasts, the question of whether or not IL-6 has antiviral activity is controversial. Many groups have been considerably unable to find any antiviral activity for recombinant human IL-6.

The various activities of IL-6 described above suggest that this factor will have a major role in the mediation of the inflammatory and immune responses initiated by infection or injury. Although the exact functions of IL-6 *in vivo* are not known, elevated IL-6 levels have been reported to be associated with a variety of diseases, including autoimmune diseases such as arthritis and Castleman's disease (4, 5, 29, 30), mesangial proliferative glomerulonephritis (4, 5), psoriasis (31), inflammatory bowel disease (32), and malignancies such as plasmacytomas (4), myelomas (2, 3, 4, 33), lymphomas and leukemias (4, 34), and ovarian cancers (35). A great deal of work is in progress in order to provide a better understanding of the role of IL 6 in the modulation of normal and pathological processes (2-5).

Current methods for assay of this interleukin are based on the mitogenic effects of IL-6 on appropriate cell lines, such as B9, a mouse B cell hybridoma line, or T1165.85.2.1, a mouse plasmacytoma cell line. These bioassays are time-consuming and are not completely specific for IL-6. The Quantikine IL-6 immunoassay is a 4.5 hour solid phase ELISA designed to measure IL-6 in cell culture supernatants, serum, and plasma. It contains recombinant human IL-6 and antibodies raised against recombinant human IL-6 and has been shown to accurately quantitate the recombinant target. Results obtained using natural IL-6

showed linear curves that were parallel to the standard curves obtained using the color expressed Quantikine kit standards. These results indicate that the Quantikine immunoassay kit can be used to determine relative mass values for natural IL-6.

It has been observed in our laboratories that the measurement of IL-6 is insensitive to the addition of the recombinant form of the IL-6 soluble receptor. Therefore it is probable that experimental sample measurements reflect the total amount of IL-6 present, i.e., the total amount of free IL-6 plus the amount of IL-6 initially bound to soluble receptors, if any are present in the samples. High levels of high-affinity autoantibodies to IL-6 in the serum of some normal blood donors have been reported (36, 37). Such autoantibodies have the potential to interfere with the measurement of IL-6 by ELISA immunoassays. While we have not detected autoantibodies against IL-6 in the serum of normal donors, this represents a potential area of concern.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

This assay employs the quantitative sandwich enzyme immunoassay technique. A monoclonal antibody specific for IL-6 has been pre-coated onto a microplate. Standards and samples are pipetted into the wells and any IL-6 present is bound by the immobilized antibody. After washing away any unbound substances, an enzyme-linked polyclonal antibody specific for IL-6 is added to the wells. Following a wash to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate solution is added to the wells and color develops in proportion to the amount of IL-6 bound in the initial step. The color development is stopped and the intensity of the color is measured.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- FOR RESEARCH/USL ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES
- The kit should not be used beyond the expiration date on the kit label
- It is important that the Calibrator Diluent selected for this standard curve be consistent with the samples being assayed
- If samples generate values higher than the highest standard, dilute the samples with the appropriate Calibrator Diluent and repeat the assay
- As manufacturers we take great care to ensure that our products are suitable for use with all validated sample types, as designated in the product insert. However, it is possible that in some cases, high levels of interfering factors may cause unusual results.
- Any variation in standard diluent, operator, pipetting technique, washing technique, incubation time or temperature, and kit age can cause variation in binding
- Soluble receptors or other binding proteins present in biological samples do not necessarily interfere with the measurement of ligands in samples. However, until the factors have been tested in the Quantikine Immunoassay, the possibility of interference cannot be excluded

REAGENTS

IL-6 Microplate (Part 890045) - 96 well polystyrene microplate (12 strips of 8 wells) coated with a murine monoclonal antibody against IL-6.

IL-6 Conjugate (Part 890046) - 21 mL of polyclonal antibody against IL-6 conjugated to horseradish peroxidase, with preservatives.

IL-6 Standard (Part 890047) - 1.5 ng of recombinant human IL-6 in a buffered protein base with preservatives, lyophilized.

Assay Diluent RD1A (Part 895005) - 11 mL of a buffered protein base with preservatives.

Calibrator Diluent RDS-A (Part 895010) - 21 mL of a buffered protein base with preservatives. *For cell culture supernate samples.*

Calibrator Diluent RDS-B (Part 895018) - 21 mL of animal serum with preservatives. *For serum/plasma samples.*

Wash Buffer Concentrate (Part 895003) - 21 mL of a 25-fold concentrated solution of buffered surfactant with preservatives.

Color Reagent A (Part 895000) - 12.5 mL of stabilized hydrogen peroxide.

Color Reagent B (Part 895001) - 12.5 mL of stabilized chromogen (tetramethylbenzidine)

Stop Solution (Part 895032) - 6 mL of 2N sulfuric acid.

Plate Covers - 4 Adhesive strips.

STORAGE

Unopened Kit	Store at 2 - 8° C Do not use past kit expiration date.
	Diluted Wash Buffer
	Stop Solution
	Calibrator Diluent RD5A
	Calibrator Diluent RD5F
Opened/ Reconstituted Reagents	May be stored for up to 1 month at 2 - 8° C*
	Assay Diluent RD1A
	Conjugate
	Unmixed Color Reagent A
	Unmixed Color Reagent B
Standard	Aliquot and store for up to 1 month at 5 - 20° C Avoid repeated freeze-thaw cycles*
Microplate Wells	Return unused wells to the foil pouch containing the desiccant pack, reseal along entire edge of zip-seal. May be stored for up to 1 month at 2 - 8° C*

* Provided this is within the expiration date of the kit.

OTHER SUPPLIES REQUIRED

- Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm, with the correction wavelength set at 540 nm or 570 nm.
- Pipettes, 50 µL, 100 µL, and 200 µL for running the assay, 1 mL, 5 mL, 10 mL, and 25 mL for reagent preparation.
- Deionized or distilled water.
- Multi-channel pipette, squirt bottle, manifold dispenser, or automated microplate washer.

PRECAUTIONS

Some components of this kit contain sodium azide which may react with lead and copper plumbing to form explosive metallic azides. Flush with large volumes of water during disposal.

The Stop Solution provided with this kit is an acid solution. Wear eye, hand, face, and clothing protection when using this material.

This kit contains Thimerosal, a mercury containing compound. The total amount of mercury in this kit is 13.3 mg.

SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

Cell Culture Supernates - Remove particulates by centrifugation and assay. Store samples at 5 - 20° C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Serum - Use a serum separator tube (SST) and allow samples to clot for 30 minutes before centrifugation for 10 minutes at approximately 1000 x g. Remove serum and assay. Store samples at 5 - 20° C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Plasma - Collect plasma using EDTA, heparin, or citrate as an anticoagulant. A rapid separation of plasma after collection, less than 30 minutes, ensures optimal recovery. Remove particulates by centrifugation and assay. Store samples at 5 - 20° C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

REAGENT PREPARATION

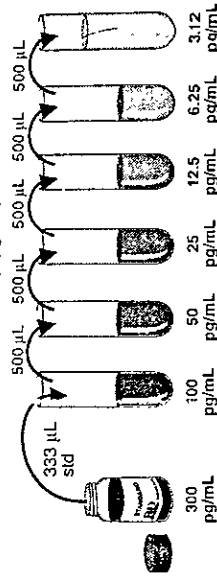
Bring all reagents to room temperature before use.

Wash Buffer - If crystals have formed in the concentrate, warm to room temperature and mix gently until the crystals have completely dissolved. Dilute 20 mL of Wash Buffer Concentrate into deionized or distilled water to prepare 500 mL of Wash Buffer.

Substrate Solution - Color Reagents A and B should be mixed together in equal volumes within 15 minutes of use. 200 µL of the resultant mixture is required per well.

IL-6 Standard - Reconstitute the IL-6 Standard with 5 mL of Calibrator Diluent RD5A (for cell culture supernate samples) or Calibrator Diluent RD5F (for serum/plasma samples). This reconstitution produces a stock solution of 300 pg/mL. Allow the standard to sit for a minimum of 15 minutes with gentle agitation prior to making dilutions.

Pipette 667 µL of the appropriate Calibrator Diluent into the 100 pg/mL tube and 500 µL of diluent into each remaining tube. Use the stock solution to produce a dilution series (below). Mix each tube thoroughly before the next transfer. The undiluted standard serves as the high standard (300 pg/mL). The appropriate Calibrator Diluent serves as the zero standard (0 pg/mL).



ASSAY PROCEDURE

Bring all reagents and samples to room temperature before use. It is recommended that all samples and standards be assayed in duplicate.

1. Prepare all reagents and working standards as directed in the previous sections.
2. Remove excess microplate strips from the plate frame, return them to the foil pouch containing the desiccant pack, reseal.
3. Add 100 μL of Assay Diluent RD1A to each well.
4. Add 100 μL of Standard or sample per well. Cover with the adhesive strip provided. Incubate for 2 hours at room temperature.
5. Aspirate each well and wash, repeating the process three times for a total of four washes. Wash by filling each well with Wash Buffer (400 μL) using a squirt bottle, multi-channel pipette, manifold dispenser or autowasher. Complete removal of liquid at each step is essential to good performance. Complete removal of liquid and remove any remaining Wash Buffer by aspirating or by inverting the plate and blotting it against clean paper toweling.
6. Add 200 μL of IL-6 Conjugate to each well. Cover with a new adhesive strip. Incubate for 2 hours at room temperature.
7. Repeat the aspiration/wash as in step 5.
8. Add 200 μL of Substrate Solution to each well. Incubate for 20 minutes at room temperature.
9. Add 50 μL of Stop Solution to each well. If color change does not appear uniform, gently tap the plate to ensure thorough mixing.
10. Determine the optical density of each well within 30 minutes, using a microplate reader set to 450 nm. If wavelength correction is available, set to 540 nm or 570 nm. If wavelength correction is not available, subtract readings at 540 nm or 570 nm from the readings at 450 nm. This subtraction will correct for optical imperfections in the plate. Readings made directly at 450 nm without correction may be higher and less accurate.

ASSAY PROCEDURE SUMMARY

1. Prepare reagents and standards as directed.
2. Add 100 μL Assay Diluent RD1A to each well.
3. Add 100 μL Standard or sample to each well. Incubate 2 hrs. RT.
4. Aspirate and wash 4 times.
5. Add 200 μL Conjugate to each well. Incubate 2 hrs. RT.
6. Aspirate and wash 4 times.
7. Add 200 μL Substrate Solution to each well. Incubate 20 min. RT.
8. Add 50 μL Stop Solution to each well. Read at 450 nm within 30 min. λ correction 540 or 570 nm

CALCULATION OF RESULTS

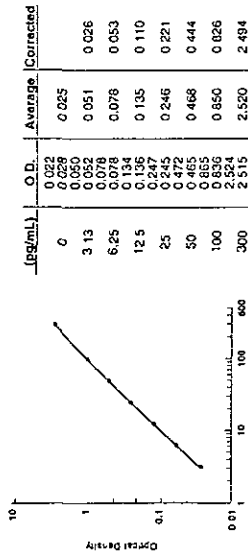
Average the duplicate readings for each standard, control, and sample and subtract the average zero standard optical density

Create a standard curve by reducing the data using computer software capable of generating a four parameter logistic (4-PL) curve fit. As an alternative, construct a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard on the y-axis against the concentration on the x-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. The data may be linearized by plotting the log of the IL-6 concentrations versus the log of the O.D. and the best fit line can be determined by regression analysis. This procedure will produce an adequate but less precise fit of the data. If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

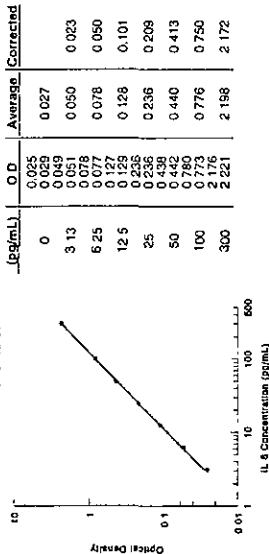
TYPICAL DATA

These standard curves are provided for demonstration only. A standard curve should be generated for each set of samples assayed

Calibrator Diluent RD5A



Calibrator Diluent RD6F



TECHNICAL HINTS

- Substrate Solution should remain colorless until added to the plate. Substrate Solution should change from colorless to *gradations of blue*. The color developed in the wells will turn from blue to yellow upon addition of the Stop Solution
- Stop Solution should be added to the plate in the same order as the Substrate Solution.
- When mixing or reconstituting protein solutions, always avoid foaming.
- To avoid cross-contamination, change pipette tips between additions of each standard level, between sample additions, and between reagent additions. Also, use separate reservoirs for each reagent.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Intra-assay Precision (Precision within an assay)
Three samples of known concentration were assayed twenty times on one plate to assess intra-assay precision.

Inter-assay Precision (Precision between assays)
Three samples of known concentration were assayed in twenty separate assays to assess inter-assay precision.

Serum/Plasma Assay

Sample	Intra-assay Precision			Inter-assay Precision		
	1	2	3	1	2	3
n	20	20	20	20	20	20
Mean (pg/mL)	16.8	97.7	186	17.2	101	191
Standard deviation	0.7	1.5	3.8	1.1	3.3	7.2
CV (%)	4.2	1.3	2.0	6.4	3.3	3.8

Cell Culture Supernate Assay

Sample	Intra-assay Precision			Inter-assay Precision		
	1	2	3	1	2	3
n	20	20	20	20	20	20
Mean (pg/mL)	15.8	95.6	179	16.4	98.8	188
Standard deviation	0.7	3.0	3.1	0.6	2.5	3.7
CV (%)	4.4	3.1	1.7	3.7	2.5	2.0

RECOVERY

The recovery of IL-6 spiked to three different levels in five samples throughout the range of the assay in various matrices was evaluated.

Sample Type	Average % Recovery	Range
Cell culture media	98	94 - 103%
Serum	93	86 - 99%
EDTA plasma	95	84 - 101%
Heparin plasma	90	88 - 98%
Citrate plasma	91	82 - 95%

LINEARITY

To assess the linearity of the assay, four samples were spiked with high concentrations of IL-6 in various matrices and diluted with the appropriate Calibrator D (uent) to produce samples with values within the dynamic range of the assay

	Cell culture media		Serum		EDTA plasma		Heparin plasma		Citrate plasma	
	Average % of Expected Range (%)	99 96-101	97 92-100	101 98-105	101 96-109	103 96-109	101 96-106	101 96-106	101 96-106	101 96-106
1.2	Average % of Expected Range (%)	100 93-110	101 93-107	104 97-110	106 97-113	105 101-109	105 101-109	105 101-109	105 101-109	105 101-109
1.4	Average % of Expected Range (%)	96 92-100	102 96-108	100 86-112	104 93-111	106 101-111	106 101-111	106 101-111	106 101-111	106 101-111
1.8	Average % of Expected Range (%)	94 83-108	103 93-111	99 90-110	105 99-107	101 90-114	101 90-114	101 90-114	101 90-114	101 90-114

SENSITIVITY

The minimum detectable dose of IL-6 was typically less than 0.70 pg/mL

The minimum detectable dose of IL-6 was determined by adding two standard deviations to the mean optical density value of 20 zero standard replicates and calculating the corresponding concentration.

CALIBRATION

This immunoassay is calibrated against a highly purified *E. coli*-derived recombinant human IL-6 produced at R&D Systems. The NIBSC/WHO international standard for IL-6 (89/548) (40), which was intended as a potency standard, was evaluated in this kit. The NIBSC/WHO standard is a CHO cell-derived recombinant human IL-6.

The dose response curve of the international standard (89/548) parallels the Quantikine standard curve. To convert sample values obtained with the Quantikine IL-6 kit to equivalent NIBSC 89/548 units when using either Calibrator Diluent RD5A or RD6F, use the equation below.

NIBSC (89/548) equivalent value (IU/mL) = $0.131 \times$ Quantikine IL-6 value (pg/mL)

EXPECTED VALUES

Serum/Plasma - Forty serum and plasma samples from apparently healthy individuals were evaluated for the presence of IL-6 in this assay. Thirty-three samples measured less than 3.13 pg/mL. Seven samples measured between 3.13 and 12.5 pg/mL.

Cell culture supernatants - Human peripheral blood mononuclear cells (1×10^6 cells/mL) from apparently healthy, normal donors were cultured in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum, 50 μ M β -mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin sulfate and activated for 1, 3, and 5 days with 10 μ g/mL PHA. Aliquots of the culture supernate were removed on days 1, 3, and 5 and assayed for levels of natural IL-6. Results are listed in the following table.

Activation Condition	Day 1 (pg/mL)	Day 3 (pg/mL)	Day 5 (pg/mL)
Unstimulated	575	311	660
Stimulated	17,130	17,520	16,340

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

SPECIFICITY

This assay recognizes both natural human IL-6 and recombinant human IL-6. The factors listed below were prepared at 50 ng/mL in Calibrator Diluent RD5A, at 100 ng/mL in Calibrator Diluent RD6F, and assayed for cross-reactivity. Preparations of the following factors at 50 ng/mL in a mid-range rIL-6 control prepared in Calibrator Diluent RD5A and 100 ng/mL in a mid-range rIL-6 control prepared in Calibrator Diluent RD6F were assayed for interference. No significant cross-reactivity or interference was observed.

Factors related to or associated with IL-6:

Recombinant human:	CNTF	Other:	rCNTF
IL-6 sR	G-CSF		
IL-6 sR/spp130	spp130		
IL-11	LIF		
IL-12	LIFR		
	OSM		

Other factors:

Recombinant human:	IL-8	Recombinant mouse:	IL-2
IL-1 α	GM-CSF	IL-3	IL-3
IL-1 β	LIF	IL-4	IL-4
IL-2	TNF- α	IL-5	IL-5
IL-3	TNF- β	IL-7	IL-7
IL-4		GM-CSF	GM-CSF
IL-7			

REFERENCES

1. Kishimoto, T. *et al.* (1992) *Science* **258**:5593
2. Kishimoto, T. (1992) *Int Arch Allergy Immunol.* **99**:172
3. Hirano, T. *et al.* (1990) *Immunol. Today* **11**:443.
4. Hirano, T. (1992) *Clin. Immunol. and Immunopathol* **62**:S60.
5. Hirano, T. *et al.* (1990) in *Peptide Growth Factors and their Receptors* I. Sporn, M.B. and A.B. Roberts eds., Springer-Verlag, New York, p. 663.
6. Hirano, T. *et al.* (1986) *Nature* **324**: 73
7. Hoegeman, G. *et al.* (1986) *Eur. J. Biochem.* **159**:625.
8. Zilberstein, A. *et al.* (1986) *EMBO J.* **5**:2529.
9. May, L.T. *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:8957.
10. Van Snick, J. *et al.* (1987) *Eur J. Immunol.* **18**:193.
11. Yasukawa, Y. *et al.* (1987) *EMBO J.* **6**:2399.
12. Okada, M. *et al.* (1983) *J. Exp. Med.* **157**:563.
13. Butler, L. *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:2475.
14. Hirano, T. *et al.* (1984) *J Immunol.* **133**:798.
15. Kikutani, H. *et al.* (1985) *J. Immunol.* **134**:990.
16. Loiz, M. *et al.* (1988) *J. Exp. Med.* **167**:1253
17. Tosato, G. and S.E. Pike (1988) *J. Immunol.* **141**:1556.
18. Uttenhove, C. *et al.* (1988) *J. Exp. Med.* **167**:1417.
19. Bauman, H. *et al.* (1984) *J. Biol. Chem.* **259**:7331.
20. Wong, G. G. *et al.* (1988) *J. Immunol.* **140**:3040.
21. Leary, A. G. *et al.* (1988) *Blood* **71**:1759.
22. Van Damme, J. *et al.* (1988) *J. Immunol.* **140**:1534.
23. Nordan, R. P. *et al.* (1987) *J. Immunol.* **139**:813.
24. Tosato, G. *et al.* (1988) *Science* **239**:502
25. Shabo, Y. *et al.* (1988) *Blood* **72**:2070
26. Satoh, T. *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* **8**:3546.
27. Hama, T. *et al.* (1989) *Neurosci. Letts.* **104**:340.
28. Ishabashi, T. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:5953.
29. Madhok, R. *et al.* (1993) *Ann. Rheum. Dis.* **52**:232
30. Wendling, D. *et al.* (1993) *J. Rheumatol.* **20**:259.
31. Grossman, R.M. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:6367.
32. Hyams, J.S. *et al.* (1993) *Gastroenterol.* **104**:1285.
33. Dunbar, C.E. and A.W. Nierhuis (1993) *JAMA* **269**:2412.
34. Kurzrock, R. *et al.* (1993) *Cancer Res.* **53**:2118.
35. Watson, J.M. *et al.* (1993) *Gynecol. Oncol.* **49**:8
36. Bendtzen, K. *et al.* (1990) *Immunol. Today* **11**:167.
37. Hansen, M.B. *et al.* (1992) *Cytokine* **5**:72.
38. Rose, T.M. and A.G. Bruce (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:8641d
39. Bazan, J.F. (1991) *Neuron* **7**:197.
40. Games Das, F.E. and S. Poole (1993) *J. Immunol. Meth.* **160**:147.

PANCREPAP

IMMUNOENZYMATIC KIT FOR ASSAYING HUMAN PAP

INSERM LICENCE



USE LIMITED TO RESEARCH

INTRODUCTION

The Pancreatitis Associated Protein (PAP) is synthesized by the exocrine pancreas in the course of acute pancreatitis. It is found in the blood within 12 hours of the onset of the pancreatitis episode. A recent study in the adult (*Gastroenterology*, 1994, 106 : 728-734) has shown that :

- Patients presenting with a normal serum PAP value at admission generally do not develop complications
- The increase in serum PAP with time is correlated with the severity of the episode and can reach 100 times the normal value (wich is generally lower than 100 ng/ml)
- A decrease in the PAP level indicates that the end of the acute phase of the crisis is ending.

Thus, analysis of the variations of the serum PAP level in a patient provides information on the progression of acute pancreatitis.

ASSAY PRINCIPLE

The PANCREPAP kit is used to assay human PAP in samples of serum, plasma or whole blood dried on blotting paper. Its principle is based on a sandwich immunoenzymatic system.

Microtitration plates are coated with polyclonal anti-PAP antibodies. In the first step, the samples to assay are deposited in the wells and PAP is allowed to bind to specific antibodies. All proteins not specifically bound are eliminated by washing. Then polyclonal anti-PAP antibodies coupled to biotin are allowed to attach to the bound PAP. After washing, antigen-antibody complexes are detected by an avidin-peroxidase complex and are visualized by the addition of a chromogenic substrate. The intensity of the color reaction is proportional to the quantity of PAP bound in the first step.



KIT COMPOSITION

REAGENTS	CHARACTERISTICS
One 75-well microtiteration plate coated with anti-PAP antibodies.	Ready to use.
Standard solution of recombinant PAP (rhPAP), freeze-dried in a protein buffer containing 0.02 % thimerosal.	Reconstitute with the volume of sterile apyrogenic H ₂ O mentioned on the vial label
Dilution buffer, freeze-dried in a protein medium containing 0.02 % thimerosal	Reconstitute with 8 ml of sterile apyrogenic H ₂ O. The 8 ml are then diluted in 42 ml sterile apyrogenic H ₂ O
Solution of biotinylated anti-PAP antibodies freeze-dried in a protein medium containing 0.02 % thimerosal	Reconstitute carefully with 10 ml sterile apyrogenic H ₂ O.
Solution of avidin-POD freeze-dried in a protein medium containing 0.02 % thimerosal.	Reconstitute carefully with 10 ml sterile apyrogenic H ₂ O
Solution of chromogenic substrate TMB	Mix with H ₂ O ₂ just before use.
Solution of chromogenic substrate H ₂ O ₂	Mix with TMB just before use
Solution of 1.5 M Orthophosphoric acid.	Ready to use.
5 PBS pellets.	Dissolve 5 pellets of PBS in 1 liter sterile apyrogenic H ₂ O to obtain 1 liter of PBS.
Solution of Tween 20 (10 %)	Dilute the 10 ml of solution to 1 liter with PBS to obtain the washing buffer

STORAGE AND STABILITY

The assay kit should be kept at 4°C until the printed expiration date. Once lyophilisates are reconstituted, they should be stored at -20°C, except for the avidin-POD solution which remains stable at 4°C. The wash solution can be stored at -20°C. With these storage conditions, the assay kit can be used for 30 days after opening.

MATERIALS NOT SUPPLIED WITH THE KIT AND NEEDED FOR THE ASSAY

Two liters of sterile apyrogenic water (wash buffer, reconstitution of assay reagents).
 Disposable tip micropipettes 200-1000 µl, 20-200 µl, 2-20 µl
 Disposable 10 ml plastic pipettes.
 A perfectly calibrated multichannel pipette or manual distributor
 4 ml plastic disposable hemolysis tubes for preparing the standard range
 One disposable plastic screw-cap tube for preparing the substrate-chromogen mixture
 A vortex mixer
 A semi-automatic or automatic plate washer, washed and abundantly rinsed with ultra-pure water before use
 A 1 l bottle rinsed with ultra-pure water to keep the wash buffer
 A 100 ml flask to keep the sample dilution buffer.

absorbent paper for eliminating residual liquid on plates after each wash.

A plate reader for measuring absorbance at 450 nm, equipped with a 620 nm reference filter.

PRECAUTIONS FOR USE

Use limited to research
 Do not pipette by mouth.
 Do not eat, drink or smoke during the test.
 Reagents containing thimerosal, H₂O₂, the H₂SO₄ solution and the PBS pellets may be toxic and irritant. They must be handled to avoid any contact with the skin, eyes and mucosae
 In case of accidentally contact, rinse the affected parts immediately with plenty of water.

RECOMMENDATIONS

Never allow the plate to dry since well drying may impair the quality of the results
 Special care should be taken to the washing steps in order to avoid non-specific signal
 Do not use reagents after their expiration date.
 Do not mix reagents from different batches.
 Avoid biological and chemical contamination of reagents and samples
 Equilibrate every reagent at room temperature.
 Freeze-dried reagents must be reconstituted at least 10 minutes before use in order to obtain total and homogeneous dissolution.
 Shake reagents gently before use
 Respect strictly incubation times.

SAMPLE TAKING AND STORING

Blood can be drawn in dry or heparinized tubes. After sampling, serum or plasma can be stored at 2 to 8°C for 24 hours, or frozen at -20°C for longer storage. Do not exceed 3 freeze/thaw cycles. Hemolysed or hyperlipemic samples of plasma or serum may interfere with the PAP assay.

PREPARATION OF REAGENTS

The plate packaged under vacuum must be equilibrated at room temperature before removal from its wrapping. Bars not used within hours must be placed in the transparent bag containing a desiccant

The wash buffer (PBS-Tween) is obtained by dissolving 5 PBS pellets in one liter of sterile apyrogenic water. After complete dissolution, the Tween 20 solution (10 %) is diluted with 990 ml of PBS.

The standard range is prepared from freeze-dried rhPAP. This standard solution is reconstituted with the volume of sterile apyrogenic water mentioned on the vial label. This gives a solution at 300 ng/ml that is further diluted in dilution buffer to prepare the standard range.

The dilution buffer is to be reconstituted first with 8 ml of sterile apyrogenic water. The 8 ml of buffer obtained are then diluted in 42 ml sterile apyrogenic water.

The lyophilisate of biotinylated anti-PAP antibodies is reconstituted with 10 ml sterile apyrogenic water

The lyophilisate of avidin-POD is reconstituted with 10 ml sterile apyrogenic water

The substrate-chromogen solution must be prepared within 10 minutes of its use. The solution containing TMB and the solution containing H₂O₂ must be mixed in equal volumes in a disposable plastic screw-cap tube. The tube is stored in the dark before use. Do not use a substrate solution already colored.

ASSAY PROCEDURE

A range of rhPAP is prepared from the freeze-dried standard solution. The biophosphate is taken up with the volume of sterile apyrogenic water mentioned on vial label and gives an rhPAP solution at 300 ng/ml. This solution is then diluted in dilution buffer. The concentrations of rhPAP recommended for the standard curve are in the range of 30 to 0.04 ng/ml.

PREPARATION OF THE RANGE

50 µl of PAP	at 300.00 ng/ml	- 450 µl of buffer = 30.00 ng/ml
150 µl of solution	at 30.00 ng/ml	- 300 µl of buffer = 10.00 ng/ml
150 µl of solution	at 10.00 ng/ml	- 300 µl of buffer = 3.33 ng/ml
150 µl of solution	at 3.33 ng/ml	- 300 µl of buffer = 1.11 ng/ml
150 µl of solution	at 1.11 ng/ml	+ 300 µl of buffer = 0.37 ng/ml
150 µl of solution	at 0.37 ng/ml	+ 300 µl of buffer = 0.12 ng/ml
150 µl of solution	at 0.12 ng/ml	- 300 µl of buffer = 0.04 ng/ml

Two wells must be reserved for depositing dilution buffer, to be used as range blank. Samples to be assayed must be diluted in dilution buffer. The range and the diluted samples are deposited on the plate at 80 µl/well and are incubated for 3 h at room temperature, covered with adhesive. The wells are then washed 5 times with PBS/0.1% Tween as follows:

- thoroughly draw up each well,
- fill with 400 µl wash buffer,
- repeat the first two steps 4 times,
- after the last wash, eliminate residual liquid by inverting the plate and tapping it on absorbent paper.

Note: it is recommended to use an automatic or semiautomatic plate washer.

The reconstituted solution of biotinylated anti-PAP antibodies is then immediately deposited on the plate at 80 µl/well and incubated for 30 minutes at room temperature. The plate is covered with adhesive. The plate is then washed 5 times with PBS/0.1% Tween (as described above) and then 80 µl of the reconstituted avidin-POD solution is immediately added to each well.

After 15 minutes incubation at room temperature, the plate is washed 5 times with PBS/0.1% Tween. During the last wash, washing buffer should be left 5 min in the wells. After the plate has been tapped dry, the chromogenic substrate is added at 80 µl/well. After 15 minutes incubation in the dark, the color reaction is stopped by adding 1.5M Orthophosphoric acid at 80 µl/well. The absorbance of each well is read on a spectrophotometric plate reader at 450 nm, using a 620 nm filter as reference filter. Plates should be read immediately after the reaction is stopped.

CALCULATION OF RESULTS

The concentration of PAP in each sample is determined by extrapolation from the standard curve. This curve is

EXAMPLE OF RESULTS

These values are provided only as an example: a standard curve must be prepared for each assay series.

Standard ng/ml	Absorbance	Mean	Absorbance (-background)
0	0.032		
0	0.035	0.033	
0.04	0.045		
0.04	0.047	0.046	0.013
0.12	0.084		
0.12	0.087	0.085	0.052
0.37	0.185		
0.37	0.181	0.183	0.150
1.11	0.450		
1.11	0.446	0.448	0.415
3.33	0.993		
3.33	0.969	0.981	0.948
10	1.735		
10	1.696	1.715	1.682
30	2.178		
30	2.139	2.158	2.125

CHARACTERISTICS OF THE TEST

1/ Detection limit

The detection limit is estimated at 32pg/ml, a PAP concentration corresponding to the mean absorbance of 20 measurements of the zero of the range plus two times the standard deviation.

2/ Specificity

Absence of cross-reaction with IL2, IL6, IFN γ , TNF α and E Coli proteins.

Absence of hook effect up to a concentration of 30 ng/ml

SUMMARY OF THE TEST

FIRST STEP

- 1.1 Prepare the standard range.
- 1.2 Once the plate is equilibrated at room temperature, remove it from its package and immediately deposit the range points and the samples to test at 80 µl/well.
- 1.3 Incubate for 3 hours at room temperature.

SECOND STEP

- 2.1 Draw up the contents of each well and immediately carry out a series of 5 washes
- 2.2 Distribute the conjugate at 80 µl/well
- 2.3 Incubate for 30 minutes at room temperature.

THIRD STEP

- 3.1 Draw up the contents of each well and wash immediately.
- 3.2 Distribute the avidin-POD at 80 µl/well.
- 3.3 Incubate for 15 minutes at room temperature.

FOURTH STEP

- 4.1 Draw up the contents of each well and wash immediately. Keep the washing buffer 5 min in the wells during the last wash.
- 4.2 Distribute the substrate at 80 µl/well