



TNF- α - EASIA

KAP1751



Read entire protocol before use.

TNF- α -EASIA

I. INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the in vitro quantitative measurement of human Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) in serum.

II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name :** DIAsource TNF- α -EASIA Kit
- B. Catalogue number :** KAP1751 : 96 tests
- C. Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological activities

Human Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) also named cachectin, is a 157 A.A. unglycosylated polypeptide cytokine mainly produced by activated macrophages (monocytes). Lipopolysaccharide (LPS), the cell-wall component of gram-negative bacteria (endotoxin), is a potent stimulus for TNF- α production by macrophages and TNF- α is an important mediator of the well-known in vivo effects of LPS such as tumour hemorrhagic necrosis, fever, shock and activation of neutrophils. The various biological activities of TNF- α may be classified as :

- *Antitumoral and growth regulatory activities* : TNF- α displays a selective toxicity for tumor and virus-infected cells. Conversely, it is angiogenic and stimulates the growth of cultured fibroblasts.
- *Immunomodulatory and proinflammatory activities* : TNF- α activates macrophages, neutrophils and eosinophils, as well as endothelial cells (which display procoagulant activity). It regulates the production of antibodies by B cells and stimulates cytotoxic T cells. It induces the production of several other inflammatory mediators such as IL-1, IL-6, colony stimulating factors, prostaglandins, platelet-activating factor (PAF), collagenases, etc.
- *Metabolic activities* : TNF- α strongly inhibits lipoprotein lipase and adipocyte gene expression.

B. Clinical application

TNF- α has a major pathogenic role : in cachexia associated with chronic infectious or cancerous diseases ; in septic shock where the neutralization of TNF- α protects against the associated acute lethality ; in graft rejection and graft-versus-host disease ; and in parasitic infections where TNF- α may provide some protection but also favours more severe forms of the disease (e.g. the cerebral form of malaria). TNF- α often in combination with other cytokines, has also been involved in several autoimmune diseases and even in the pathogenesis of arteriosclerosis. Abnormal high levels of serum TNF- α have been described in septic shock, graft rejection, parasitic infections, cancer, post hemofiltrations, during in vivo cytokine (IL-2) therapy, etc. Besides an insight into pathogenesis, these determinations might provide an aid in diagnosis (e.g. in graft rejection) and have prognostic value (e.g. in systemic infections).

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIAsource TNF- α -EASIA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on microtiterplate. The assay uses monoclonal antibodies (MABs) directed against distinct epitopes of TNF- α . Calibrators and samples react with the capture monoclonal antibody (MAB 1) coated on microtiter well and with a monoclonal antibody (MAB 2) labelled with horseradish peroxidase (HRP). After an incubation period allowing the formation of a sandwich: coated MAB 1 – human TNF- α – MAB 2 – HRP, the microtiterplate is washed to remove unbound enzyme labelled antibody. Bound enzyme-labelled antibody is measured through a chromogenic reaction. Chromogenic solution (TMB) is added and incubated. The reaction is stopped with the addition of Stop Solution and the microtiterplate is then read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is proportional to the TNF- α concentration.

A calibration curve is plotted and TNF- α concentration in samples is determined by interpolation from the calibration curve. The use of the EASIA reader (linearity up to 3 OD units) and a sophisticated data reduction method (polychromatic data reduction) result in a high sensitivity in the low range and in an extended calibration range.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 tests Kit	Color Code	Reconstitution			
 Microtiterplate with 96 anti TNF- α (monoclonal antibodies) coated wells	96 wells	blue	Ready for use			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>HRP</td></tr></table> Conjugate: HRP labelled anti-TNF- α (monoclonal antibodies) in TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin and thymol	Ab	HRP	1 vial 0.75 ml	red	Add conjugate buffer (see section VII)	
Ab	HRP					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Zero calibrator in human serum, benzamadin and thymol	CAL	0	2 vials lyophil.	yellow	Add distilled water (see on the label for the exact volume)	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrator N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in human serum, benzamadin and thymol	CAL	N	5 vials lyophil.	yellow	Add 2 ml distilled water	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>CONJ</td><td>BUF</td></tr></table> Conjugate buffer: TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin, EDTA and thymol	CONJ	BUF	1 vial 6 ml	red	Ready for use	
CONJ	BUF					
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Incubation buffer: TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin, EDTA and thymol	INC	BUF	1 vial 6 ml	black	Ready for use	
INC	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wash Solution (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	brown	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controls - N = 1 or 2 in human serum and thymol	CONTROL	N	2 vials lyophil.	silver	Add 2 ml distilled water	
CONTROL	N					
<table border="1"><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td><td>CONC</td></tr></table> Chromogen TMB (Tetramethylbenzidine) in Dimethylformamide	CHROM	TMB	CONC	1 vial 1 ml	green	Dilute 0.2 ml into 1 vial of substrate buffer
CHROM	TMB	CONC				
<table border="1"><tr><td>SUB</td><td>BUF</td></tr></table> Substrate buffer: H ₂ O ₂ in acetate / citrate buffer	SUB	BUF	3 vials 21 ml	white	Ready for use	
SUB	BUF					
<table border="1"><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> Stopping solution: H ₂ SO ₄ 1.8N	STOP	SOLN	1 vial 6 ml	black	Ready for use	
STOP	SOLN					

Note: 1. Use the zero calibrator for sample dilutions.
2. 1 pg of the calibrator preparation is equivalent to 40 mIU of the NIBSC IS 87/650.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

- High quality distilled water
- Pipettes for delivery of: 50 μ l, 200 μ l, 1 ml and 10 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Horizontal microtiterplate shaker capable of 700 rpm $\pm$ 100 rpm
- Washer for Microtiterplates
- Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm, 490 nm and 650 nm (in case of polychromatic reading) or capable of reading at 450 nm and 650 nm (bichromatic reading)
- Optional equipment: The ELISA-AID™ necessary to read the plate according to polychromatic reading (see paragraph XI.A.) can be purchased from Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. REAGENT PREPARATION

- A. **Calibrators** : Reconstitute the zero calibrator to the volume specified on the vial label with distilled water and the other calibrators with 2 ml distilled water.
- B. **Controls** : Reconstitute the controls with 2 ml distilled water.
- C. **Conjugate Solution** : following the number of wells to be used, dilute the concentrated conjugate with the conjugate buffer in a clean glass vial : see below table for the volumes to pipette. Extemporaneous preparation is recommended. Diluted conjugate is stable for max. 1 week at 2-8°C.

TABLE CONJUGATE DILUTION			
Number of wells	Concentrated conjugate	Conjugate buffer	Working volume
8	50 μ l	500 μ l	550 μ l
16	100 μ l	1000 μ l	1100 μ l
24	150 μ l	1500 μ l	1650 μ l
32	200 μ l	2000 μ l	2200 μ l
48	300 μ l	3000 μ l	3300 μ l
96	600 μ l	6000 μ l	6600 μ l

- D. **Working Wash solution** : Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 199 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (200x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.
- E. **Revelation Solution**: pipette 0.2 ml of the chromogen TMB into one of the vials of substrate buffer (H₂O₂ in acetate/citrate buffer). Extemporaneous preparation is recommended.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- § Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the vial label, if kept at 2 to 8°C.
- § Unused strips must be stored, at 2-8°C, in a sealed bag containing a desiccant until expiration date.
- § After reconstitution, calibrators and controls are stable for 4 days at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 2 months. Avoid successive freeze thaw cycles.
- § The concentrated Wash Solution is stable at room temperature until expiration date.
- § Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- § After its first use, the conjugate is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- § The freshly prepared revelation solution is stable, before use, for maximum 15 minutes at room temperature and must be discarded afterwards.
- § Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- § Serum must be removed as soon as possible from the clot of red cells after clotting and centrifugation, and kept at 4°C. If the samples are not used immediately, they must be kept at -20°C for maximum 2 months, and at -70°C for longer storage (maximum one year).
- § Avoid subsequent freeze thaw cycles.
- § Prior to use, all samples should be at room temperature. It is recommended to vortex the samples before use.

- § Sampling conditions can affect values, therefore, strict precautions have to be taken during sampling to avoid impurities contained in sampling materials that would stimulate TNF- α production by blood cells and thus falsely increase serum TNF- α values.
- § Collection tubes must be pyrogen-free.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date.
Do not mix materials from different kit lots.
Bring all the reagents to room temperature prior to use.
Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
Use a clean plastic container to prepare the Wash Solution.
In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
For the dispensing of the Revelation Solution and the Stop Solution avoid pipettes with metal parts.
High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
Respect the incubation times.
To avoid drift, the time between pipetting of the first calibrator and the last sample must be limited to the time mentioned in section XIII paragraph E (Time delay).
Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.
The Revelation Solution should be colourless. If a blue colour develops within a few minutes after preparation, this indicates that the reagent is unusable, and must be discarded.
Dispense the Revelation Solution within 15 minutes following the washing of the microtiterplate.
During incubation with Revelation Solution, avoid direct sunlight on the microtiterplate.

B. Procedure

- Select the required number of strips for the run. The unused strips should be resealed in the bag with a desiccant and stored at 2-8°C.
- Secure the strips into the holding frame.
- Pipette 50 μ l of incubation buffer into all the wells
- Pipette 200 μ l of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
- Incubate for 2 hours at room temperature on a horizontal shaker set at 700 rpm $\pm$ 100 rpm.
- Aspirate the liquid from each well.
- Wash the plate 3 times by:
 - § Dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well
 - § Aspirating the content of each well
- Pipette 100 μ l of zero calibrator into all the wells
- Pipette 50 μ l of anti- TNF- α -HRP conjugate into all the wells.
- Incubate for 2 hours at room temperature on a horizontal shaker set at 700 rpm $\pm$ 100 rpm.
- Aspirate the liquid from each well.
- Wash the plate 3 times by:
 - § Dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well
 - § Aspirating the content of each well
- Pipette 200 μ l of the freshly prepared revelation solution into each well within 15 minutes following the washing step.
- Incubate the microtiterplate for 30 minutes at room temperature on a horizontal shaker set at 700 rpm $\pm$ 100 rpm, avoid direct sunlight.
- Pipette 50 μ l of Stop solution into each well.
- Read the absorbencies at 450 nm and 490 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 3 hours and calculate the results as described in section XI.

XI. CALCULATION OF RESULTS

A. Polychromatic Reading:

- In this case, the ELISA-AID™ software will do the data processing.
- The plate is first read at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
- A second reading is performed at 490 nm against the same reference filter.
- The ELISA-AID™ Software will drive the reader automatically and will integrate both readings into a polychromatic model. This technique can generate OD's up to 10.
- The principle of polychromatic data processing is as follows:
 - § X_i = OD at 450 nm
 - § Y_i = OD at 490 nm
 - § Using a standard unweighted linear regression, the parameters A & B are calculated : $Y = A \cdot X + B$
 - § If $X_i < 3$ OD units, then X calculated = X_i

- § If $X_i > 3$ OD units, then X calculated = $(Y_i - B)/A$
- § A 4 parameter logistic curve fitting is used to build up the calibration curve.
- § The TNF- α concentration in samples is determined by interpolation on the calibration curve.

B. Bichromatic Reading

- Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
- Calculate the mean of duplicate determinations.
- On semi-logarithmic or linear graph paper plot the OD values (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of TNF- α (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points by connecting the plotted points with straight lines.
- Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
- Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4 parameter logistic function curve fitting is recommended.

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

TNF- α -EASIA		OD units Polychromatic model
Calibrator	0 pg/ml	0.045
	6.8 pg/ml	0.120
	18 pg/ml	0.259
	52 pg/ml	0.619
	176 pg/ml	1.435
	518 pg/ml	3.237

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection Limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations above the average OD at zero binding, was 0.7 pg/ml.

B. Specificity

No significant cross-reaction was observed in presence of 50 ng of IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TNF- β , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TGF- β , GM-CSF, OSM, MIP-1 α , MIP-1 β , LIF, MCP-1, G-CSF and RANTES. This TNF- α assay is specific for human natural and recombinant TNF- α .

C. Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> $\pm$ SD (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> $\pm$ SD (pg/ml)	CV (%)
A	20	91 $\pm$ 6	6.6	A	24	122 $\pm$ 5	4.5
B	20	526 $\pm$ 33	6.3	B	24	431 $\pm$ 14	3.3

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST

Sample	Added TNF- α (pg/ml)	Recovered TNF- α (pg/ml)	Recovery (%)
Serum 1	0	6.2	-
	38.4	43.3	97
	83.9	90.0	100
	188.3	192.5	99
	408.2	376.2	91
Serum 2	0	3.8	-
	38.4	45.5	108
	83.9	91.2	104
	188.3	162.2	84
	408.2	379.2	92

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (pg/ml)	Measured Concent. (pg/ml)
Serum 1	1	-	436.5
	2	218.3	212.4
	4	109.1	104.8
	8	54.6	59.5
	16	27.3	31.7
Serum 2	1	-	420.2
	2	210.1	211.2
	4	105.0	98
	8	52.5	58.3
	16	26.3	30.7

Samples were diluted with zero calibrator.

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

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

	T0	30 min	45 min
SC1	202	183	222
SC2	506	520	565

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- § If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- § If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Controls that contain azide will interfere with the enzymatic reaction and cannot be used.
- § Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practices
- § It is recommended that controls be routinely assayed as unknown samples to measure assay variability. The performance of the assay should be monitored with quality control charts of the controls.
- § It is good practise to check visually the curve fit selected by the computer.

XV. REFERENCE INTERVALS

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

For guidance, the results of 30 serum samples from apparently healthy persons with low CRP levels, ranged between 4.6 and 12.4 pg/ml.

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with all reagents, Stop Solution contains H₂SO₄, the chromogen contains TMB in Dimethylformamide, Substrate buffer contains H₂O₂. In case of contact, wash thoroughly with water.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

XVII. BIBLIOGRAPHY

- BEUTLER B., CERAMI A. (1987)
Cachectin : more than a tumor necrosis factor.
N. Engl. J. Med., 316 ; 379-385.
- TRACEY K.J., FONG Y., HESSE D.G., MANOGUE K.R., LEE A.T., KUO G.C., LOWRY S.F. and CERAMI A. (1987)
Anti cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia.
Nature, 330 : 662-664.
- PIGUET P.F., GRAU G.E., ALLET B. and VASSALLI P. (1987)
Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-versus-host disease.
J. Exp. Med., 166 ; 1280-1289.
- AUKRUST P., LIABAKK N-B., MÜLLER F., LIEN E., ESPEVIK T. and FROLAND S.S. (1994)
Serum Levels of Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) and Soluble TNF Receptors in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection - Correlations to Clinical Immunologic, and Virologic Parameters.
J. Inf. Dis., 169:420-424.
- WAAGE A., HALSTENSEN A. and ESPEVIK T. (1987)
Association between tumor necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease.
Lancet, 1 ; 355-357.
- LEROUX-ROELS G., OFFNER F., PHILIPPE J. and VERMEULEN A. (1988)
Influence of Blood-Collecting Systems on Concentrations of Tumor Necrosis Factor in Serum and Plasma.
Clin. Chem., 34 ; 2373-2374.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	CALIBRATORS (μ l)	SAMPLE(S) CONTROLS (μ l)
Incubation buffer Calibrators (0-5) Samples, Controls	50 200 -	50 - 200
Incubate for 2 hours at room temperature with continuous shaking at 700 rpm. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 μ l of Wash Solution and aspirate.		
Zero Calibrator Anti-TNF- α -HRP conjugate	100 50	100 50
Incubate for 2 hours at room temperature with continuous shaking at 700 rpm. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 μ l of Wash Solution and aspirate.		
Revelation Solution	200	200
Incubate for 30 min at room temperature with continuous shaking at 700 rpm.		
Stop Solution	50	50
Read on a microtiterplate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (and 490 nm) versus 630 (or 650 nm)		

DIAsource Catalogue Nr : KAP1751	P.I. Number : 1700571/en	Revision nr : 090508/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

TNF- α -EASIA

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage immuno-enzymatique pour la mesure quantitative *in vitro* du Facteur de Nécrose Tumorale α humain (TNF- α) dans le sérum.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource TNF- α -EASIA kit
- B. **Numéro de catalogue :** KAP1751 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8 B-1400 Nivelles Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. Activités biologiques

Le Facteur de Nécrose Tumorale Alpha (TNF- α), également appelé cachectine, est une cytokine polypeptidique non glycosylée de 157 acides aminés produite principalement par les macrophages activés (monocytes). Le lipopolysaccharide (LPS), composant de la paroi cellulaire des bactéries gram négatives (endotoxine), est un puissant stimulus de la production du TNF- α par les macrophages et le TNF- α est un médiateur important des effets *in vivo* bien connus du LPS: par exemple, nécrose tumorale hémorragique, fièvre, choc et activations des neutrophiles. Les différentes activités biologiques du TNF- α peuvent se classer de la manière suivante :

. *Activités antitumorales et de régulation de croissance* : le TNF- α montre une toxicité sélective pour les tumeurs et les cellules infectées par un virus. Inversement, il est angiogénique et stimule la croissance des fibroblastes mis en culture.

. *Activités immunorégulatrices et pro-inflammatoires* : le TNF- α active les macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles, ainsi que les cellules endothéliales (qui montrent une activité procoagulante). Il régule la production des anticorps par les cellules B et stimule les cellules T cytotoxiques. Il induit la production de plusieurs autres médiateurs de l'inflammation comme les IL-1, IL-6, facteurs stimulant de colonies, prostaglandines, facteur d'activation des plaquettes (PAF), collagénases, etc.

. *Activités métaboliques* : le TNF- α inhibe fortement la lipoprotéine lipase et l'expression des gènes des adipocytes.

B. Applications cliniques

Le TNF- α a un rôle pathogénique majeur : dans les cachexies associées aux infections chroniques ou aux cancers ; dans le choc septique où la neutralisation du TNF- α protège contre la létalité aiguë qui y est associée ; dans le rejet de greffe et la maladie greffon contre hôte ; et dans les infections parasitaires où le TNF- α peut procurer une certaine protection, mais favorise également des formes plus sévères de la maladie (par ex. la forme cérébrale de la malaria). Le TNF- α , souvent en combinaison avec d'autres cytokines, a également été impliqué dans plusieurs maladies auto-immunes et même dans la pathogenèse de l'artériosclérose. Des taux anormalement élevés du TNF- α sérique ont été décrits dans le choc septique, le rejet de greffe, les infections parasitaires, le cancer, après une hémofiltration, pendant un traitement *in vivo* par la cytokine (IL-2), etc. En plus de donner un aperçu de la pathogenèse, ces déterminations peuvent procurer une aide au diagnostic (par ex. dans le rejet de greffe) et ont une valeur pronostique (par ex. dans les infections systémiques).

IV. PRINCIPES DU DOSAGE

La DIASource TNF- α -EASIA est une « Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay » en phase solide effectuée sur des microplaques. L’analyse utilise des anticorps monoclonaux (AcM) dirigés contre des épitopes distincts de l’TNF- α . Les calibrateurs et les échantillons réagissent avec l’anticorps de capture monoclonal (AcM 1) recouvrant les puits et avec un anticorps monoclonal (AcM 2) marqué avec la peroxydase (HRP). Après une période d’incubation permettant la formation d’un sandwich: AcM 1 recouvert – TNF- α – AcM 2 – HRP, la microplaque est lavée afin d’enlever l’anticorps libre marqué enzymatiquement. L’anticorps lié marqué enzymatiquement est mesuré avec une réaction chromogénique. Une solution chromogénique (TMB – H₂O₂) est ajoutée et incubée. La réaction est arrêtée avec l’addition de Solution d’arrêt et la microplaque est alors lue à la longueur d’onde appropriée. La quantité de remplacement de substrat est déterminée colorimétriquement par la mesure de l’absorbance, qui est proportionnelle à la concentration en TNF- α . Une courbe de calibration est dessinée et la concentration en TNF- α dans les échantillons est déterminée par interpolation de la courbe de calibration. L’utilisation du lecteur EASIA (linéarité jusque 3 unités de DO) et une méthode de réduction de données sophistiquée (réduction de données polychromatique) résultent en une haute sensibilité dans la portée basse et en une portée de calibration étendue.

V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs		96 tests Kit	Code Couleur	Reconstitution
 Microplaque de titration avec 96 puits recouvert d'anti TNF- α (anticorps monoclonal)		96 puits	bleu	Prêt à l'emploi
Ab HRP Conjugué: anti-TNF- α marqué avec de l'HRP (anticorps monoclonal) dans un tampon TRIS-maléate avec de l'albumine bovine et du thymol		1 flacon 0,75 ml	Rouge	Ajouter le tampon du conjugué (voir section VII)
CAL 0 Calibrateur zéro dans du sérum humain avec de la benzamidine et du thymol		2 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter de l'eau distillée (voir le volume exact sur l'étiquette)
CAL N Calibrateur N = 1 à 5 (cfr. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans du sérum humain avec de la benzamidine et du thymol		5 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 2 ml d'eau distillée
CONJ BUF Tampon conjugué: Tampon TRIS-maléate avec de l'albumine bovine, EDTA et du thymol		1 flacon 6 ml	Rouge	Prêt à l'emploi
INC BUF Tampon d'incubation: Tampon TRIS-maléate avec de l'albumine bovine, EDTA et du thymol		1 flacon 6 ml	Noir	Prêt à l'emploi
WASH SOLN CONC Solution de Lavage (Tris-HCl)		1 flacon 10 ml	Brun	Diluer 200 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
CONTROL N Contrôles - N = 1 ou 2 dans du sérum humain avec du thymol		2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 2 ml d'eau distillée
CHROM TMB CONC Chromogène TMB (Tetramethylbenzidine) dans Dimethylformamide		1 flacon 1 ml	Vert	Diluer 0,2 ml dans 1 flacon de tampon substrat
SUB BUF Tampon substrat: H ₂ O ₂ dans tampon acétate / citrate		3 flacons 21 ml	Blanc	Prêt à l'emploi
STOP SOLN Solution d'arrêt: H ₂ SO ₄ 1.8N		1 flacon 6 ml	Noir	Prêt à l'emploi

Note: 1. Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons.

2. 1 pg de la préparation du calibrateur est équivalent à 40 mU du IS NIBSC 87/650.

VI. MATERIELS NON FOURNIS

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

- Eau distillée d’une haute qualité
- Pipettes pour distribuer: 50 μ l, 200 μ l, 1 ml et 10 ml (l’utilisation de pipettes précises et de pointes en plastique est recommandée)
- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique
- Agitateur de microplaques horizontal capable de 700 rpm $\pm$ 100 rpm
- Laveur de microplaques
- Lecteur de microplaques capable de lire à 450 nm, 490 nm et 650 nm (en cas de lecture polychromatique) ou capable de lire à 450 nm et 650 nm (lecture monochromatique)
- Equipped supplémentaire: le ELISA-AID™ nécessaire pour lire la plaque selon la lecture polychromatique (voir paragraphe XI.A.) peut être acheté chez Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. **Calibrateurs** : Reconstituer le Calibrateur zéro avec le volume d’eau distillée spécifié sur l’étiquette du flacon et les autres calibrateurs avec 2 ml d’eau distillée.
- B. **Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 2 ml d’eau distillée.
- C. **Solution du conjugué** : en fonction du nombre de puits à utiliser, diluer le conjugué concentré avec le tampon du conjugué dans un flacon en verre propre : voir le tableau ci-dessous pour connaître les volumes à pipeter. Il est recommandé de réaliser la préparation au moment de l’utiliser. Le conjugué dilué est stable au maximum une semaine entre 2 et 8°C.

TABLEAU DE DILUTION DU CONJUGUE

Nombre de puits	Conjugué concentré	Tampon du conjugué	Volume de travail
8	50 μ l	500 μ l	550 μ l
16	100 μ l	1000 μ l	1100 μ l
24	150 μ l	1500 μ l	1650 μ l
32	200 μ l	2000 μ l	2200 μ l
48	300 μ l	3000 μ l	3300 μ l
96	600 μ l	6000 μ l	6600 μ l

- D. **Solution de Lavage** : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 199 volumes d’eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (200x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.
- E. **Solution de Révélation**: pipeter 0,2 ml du chromogène TMB dans un des flacons avec du tampon substrat (H₂O₂ dans tampon acétate/citrate). Une préparation extemporanée est recommandée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D’EXPIRATION DES REACTIFS

- § Avant l’ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu’à la date d’expiration, indiquée sur l’étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- § Des barrettes inutilisées doivent être gardées, à 2-8°C, dans un sachet cacheté contenant un dessiccant jusqu’à la date d’expiration.
- § Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables pendant 4 jours entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquotes devront être réalisées et celles-ci seront gardées à –20°C pendant 2 mois. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- § La Solution de Lavage concentrée est stable à température ambiante jusqu’à la date d’expiration.
- § La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- § Après la première utilisation, le conjugué est stable jusqu’à la date d’expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d’origine correctement fermé.
- § La Solution de Révélation qui vient d’être préparée est stable, avant l’utilisation, pour 15 minutes au maximum à température ambiante et doit être jetée après.
- § Des altérations dans l’apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L’ECHANTILLON

- § Le sérum doit être débarrassé le plus rapidement possible du caillot de globules rouges après coagulation et centrifugation. Il doit être conservé à 4°C. Si les échantillons ne sont pas tout de suite utilisés, ils doivent être conservés à -70°C, au maximum pendant 1 an.
- § Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.

- § Avant l'utilisation des échantillons, ceux-ci doivent être à température ambiante. On recommande de vortexer les échantillons avant de les utiliser.
- § Les conditions de la prise d'échantillon pouvant affecter les résultats, il faut prendre de strictes précautions pendant la prise d'échantillon afin d'éviter que des impuretés contenues dans le matériel de prélèvement ne stimulent la production d'TNF- α par les cellules sanguines et ne fassent faussement augmenter les taux sériques d'TNF- α .
- § Les tubes de prélèvement doivent être pyrogen-free.

X. *MODE OPERATOIRE*

- A. *Notes de manipulation***
- Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration.
- Ne pas mélanger du matériel provenant de trousse de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation. Mélangez tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Réaliser les calibrateurs, les contrôles et les échantillons en double. Un alignement vertical est recommandé.
- Utiliser un récipient en plastic propre pour préparer la Solution de Lavage. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon. Pour la distribution de la Solution de Révélation et de la Solution d'arrêt, éviter des pipettes avec des parties en métal.
- Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision.
- Respecter les temps d'incubation.
- Afin d'éviter des anomalies, le délai entre le pipetage du premier calibrateur et celui du dernier échantillon doit être limité au délai indiqué à la section XIII paragraphe E (Délai).
- Préparer une courbe d'étalonnage pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.
- Distribuer la Solution de Révélation dans les 15 minutes après le lavage de la microplaque de titration.
- Eviter exposition à la lumière du soleil lors de l'incubation avec la Solution de Révélation.

- B. *Mode opératoire***
- Sélectionner le nombre de barrettes nécessaires pour le test. Les barrettes inutilisées doivent être cachetées de nouveau dans le sachet avec un dessiccatif et gardées à 2-8°C.
 - Placer les barrettes dans le support.
 - Pipeter 50 µl du tampon d'incubation dans tous les puits.
 - Pipeter 200 µl de chaque Calibrateur, Contrôle et Echantillon dans les puits appropriés.
 - Incuber pendant 2 heures à température ambiante dans un agitateur horizontal mis à 700 rpm ± 100 rpm.
 - Aspirer le liquide de chaque puits.
 - Laver la plaque 3 fois en:
 - § distribuant 0.4 ml de la Solution de Lavage dans chaque puits
 - § aspirant le contenu de chaque puits
 - Pipeter 100 µl du calibrateur zéro dans tous les puits.
 - Pipeter 50 µl du conjugué anti-TNF- α -HRP dans tous les puits.
 - Incuber pendant 2 heures à température ambiante dans un agitateur horizontal mis à 700 rpm ± 100 rpm.
 - Aspirer le liquide de chaque puits.
 - Laver la plaque 3 fois en:
 - § distribuant 0.4 ml de la Solution de Lavage dans chaque puits
 - § aspirant le contenu de chaque puits
 - Pipeter 200 µl de la Solution de Révélation qui vient d'être préparée dans chaque puits dans les 15 minutes après la phase de lavage.
 - Incuber la microplaque pendant 30 minutes à température ambiante dans un agitateur horizontal mis à 700 rpm ± 100 rpm, éviter exposition à la lumière du soleil.
 - Pipeter 50 µl de la Solution d'arrêt dans chaque puits.
 - Lire les absorbances à 450 nm et 490 nm (filtre de référence 630 nm ou 650 nm) dans 3 heures et calculer les résultats comme décrits dans la section XI.

XI. *CALCUL DES RESULTATS*

- A. *Lecture polychromatique:***
- En ce cas, le software ELISA-AID™ fera le traitement des données.
 - La plaque est lue d'abord à 450 nm contre un filtre de référence mis à 650 nm (ou 630 nm).
 - Une seconde lecture est effectuée à 490 nm contre le même filtre de référence.
 - Le software ELISA-AID™ manœuvrera le lecteur automatiquement et intégrera les deux lectures dans un modèle polychromatique. Cette technique peut générer des DO jusqu'à 10.
 - Le principe du traitement de données polychromatique est le suivant:
 - § Xi = DO à 450 nm
 - § Yi = DO à 490 nm

- § Utilisant une régression linéaire non pondérée standard, les paramètres A & B sont calculés : $Y = A \cdot X + B$
- § Si $X_i < 3$ unités DO, X calculé = X_i
- § Si $X_i > 3$ unités DO, X calculé = $(Y_i - B) / A$
- § Un lissage de courbes « 4 paramètres » est utilisé pour la courbe de calibration.
- § La concentration en TNF- α des échantillons est déterminée par interpolation sur la courbe de calibration.

- B. *Lecture bichromatique***
- Lire la plaque à 450 nm contre un filtre de référence mis à 650 nm (ou 630 nm).
 - Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
 - Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les cpm (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en TNF- α (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l'aide des points de calibration, en connectant les points avec des lignes droites.
 - Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.
 - L'analyse informatique des données simplifiera les calculs. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.

XII. *DONNEES TYPES*

Les données représentées ci-dessous sont fournies pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe d'étalonnage.

TNF- α -EASIA		Unités DO modèle polychromatique
Calibrateur	0 pg/ml	0,045
	6,8 pg/ml	0,120
	18 pg/ml	0,259
	52 pg/ml	0,619
	176 pg/ml	1,435
	518 pg/ml	3,237

XIII. *PERFORMANCE ET LIMITES*

- A. *Sensibilité***
- Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne DO déterminée à la fixation zéro, était de 0,7 pg/ml.
- B. *Spécificité***
- On n'a pas constaté de réaction croisée significative en présence de 50 ng IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TNF- β , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TGF- β , GM-CSF, OSM , MIP-1 α , MIP-1 β , LIF, MCP-1, G-CSF et RANTES. Ce dosage de l'TNF- α est spécifique de l'TNF- α humaine naturelle et recombinante.

C. *Précision*

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	20	91 ± 6	6,6	A	24	122 ± 5	4,5
B	20	526 ± 33	6,3	B	24	431 ± 14	3,3

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. *Exactitude*

TEST DE RECUPERATION			
Echantillon	TNF- α ajoutée (pg/ml)	TNF- α récupérée (pg/ml)	Récupération (%)
Sérum 1	0	6,2	-
	38,4	43,3	97
	83,9	90,0	100
	188,3	192,5	99
	408,2	376,2	91
Sérum 2	0	3,8	-
	38,4	45,5	108
	83,9	91,2	104
	188,3	162,2	84
	408,2	379,2	92

TEST DE DILUTION

Echantillon	Dilution	Concent. théorique (pg/ml)	Concent. Mesurée (pg/ml)
Sérum 1	1	-	436,5
	2	218,3	212,4
	4	109,1	104,8
	8	54,6	59,5
	16	27,3	31,7
Sérum 2	1	-	420,2
	2	210,1	211,2
	4	105,0	98
	8	52,5	58,3
	16	26,3	30,7

Les échantillons ont été dilués avec le calibrateur zéro.

E. Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon

Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 30 minutes après que le calibrateur a été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

DELAI

	T0	30 min	45 min
SC1	202	183	222
SC2	506	520	565

XIV. CONTROLE DE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés. Des contrôles qui contiennent de l'azote influenceront la réaction enzymatique et ne peuvent pas être utilisés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en double des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.
- On recommande que les contrôles soient testés de façon routinière comme des échantillons inconnus pour mesurer la variabilité du test. La réalisation du test doit être suivie avec des fichiers de contrôle de qualité des contrôles.
- On recommande de vérifier visuellement la courbe sélectionnée par l'ordinateur.

XV. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont données à titre d'information; chaque laboratoire doit établir ses propres fourchettes de valeurs normales.

A titre indicatif, les résultats de 30 échantillons de sérum de personnes apparemment saines avec de faibles niveaux de CRP se situaient entre 4,6 et 12,4 pg/ml.

XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devra être conforme aux procédures locales de sécurité.

Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

Eviter le contact de la peau avec tous les réactifs. La Solution d'arrêt contient de l'H₂SO₄, le chromogène contient de la TMB dans de la Diméthylformamide, le Tampon Substrat contient de l'H₂O₂. En cas de contact, laver avec beaucoup d'eau.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

- BEUTLER B., CERAMI A. (1987)
Cachectin : more than a tumor necrosis factor.
N. Engl. J. Med., 316 ; 379-385.
- TRACEY K.J., FONG Y., HESSE D.G., MANOGUE K.R., LEE A.T., KUO G.C., LOWRY S.F. and CERAMI A. (1987)
Anti cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia.
Nature, 330 : 662-664.
- PIGUET P.F., GRAU G.E., ALLET B. and VASSALLI P. (1987)
Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-versus-host disease.
J. Exp. Med., 166 ; 1280-1289.
- AUKRUST P., LIABAKK N-B., MÜLLER F., LIEN E., ESPEVIK T. and FROLAND S.S. (1994)
Serum Levels of Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) and Soluble TNF Receptors in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection - Correlations to Clinical Immunologic, and Virologic Parameters.
J. Inf. Dis., 169:420-424.
- WAAGE A., HALSTENSEN A. and ESPEVIK T. (1987)
Association between tumor necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease.
Lancet, 1 ; 355-357.
- LEROUX-ROELS G., OFFNER F., PHILIPPE J. and VERMEULEN A. (1988)
Influence of Blood-Collecting Systems on Concentrations of Tumor Necrosis Factor in Serum and Plasma.
Clin. Chem., 34 ; 2373-2374.

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

	CALIBRATEURS (µl)	ECHANTILLON(S) CONTROLES (µl)
Tampon d'incubation	50	50
Calibrateurs (0-5)	200	-
Echantillons, Contrôles	-	200
Incuber pendant 2 heures à température ambiante avec agitation continue à 700 rpm. Aspirer le contenu de chaque puits. Laver 3 fois avec 400 µl de la Solution de Lavage et aspirer.		
Calibrateur zéro	100	100
Conjugué Anti-TNF- α -HRP	50	50
Incuber pendant 2 heures à température ambiante avec agitation continue à 700 rpm. Aspirer le contenu de chaque puits. Laver 3 fois avec 400 µl de la Solution de Lavage et aspirer.		
Solution de Révélation	200	200
Incuber pendant 30 min à température ambiante avec agitation continue à 700 rpm.		
Solution d'arrêt	50	50
Lire sur un lecteur de microplaques et enregistrer l'absorbance de chaque puits à 450 nm (contre 630 ou 650 nm) et 490 nm (contre 630 ou 650 nm)		

DIASource Catalogue Nr : KAP1751	P.I. Number : 1700571/fr	Revision nr : 090508/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Date de révision : 2009-05-08

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

TNF- α -EASIA

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein immunenzymetrisches Assay für die quantitative *in vitro* Bestimmung des humanen Tumor-Nekrose-Faktors α (TNF- α) in Serum.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource TNF- α -EASIA Kit
- B. **Katalognummer :** KAP1751 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Biologische Aktivität

Der humane Tumor-Nekrose-Faktor Alpha (TNF- α) auch Cachectin genannt, ist ein 157 A.A. unglykosyliertes Polypeptid-Zytokin was hauptsächlich von aktivierten Makrophagen (Monozyten) hergestellt wird. Lipopolysaccharid (LPS), die Zellwand-Komponente gramnegativer Bakterien (Endotoxin), ist ein potenter Stimulus für die TNF- α Produktion durch Makrophagen und TNF- α stellt einen wichtigen Mediator des wohlbekannten *in vivo* Effekts von LPS wie z.B. der Tumor hämorrhagischer Nekrose, Fieber, Schock und Aktivierung der Neutrophile. Die verschiedenen biologischen Aktivitäten von TNF- α können folgendermaßen charakterisiert werden :

- **Antitumoral und wachstumsregulierende Aktivitäten :** TNF- α zeigt eine selektive Toxizität für Tumore und Virus-infizierte Zellen. Umgekehrt wirkt es angiogenisch und stimuliert das Wachstum gezüchteter Fibroblasten
- **Immunomodulatorische und proinflammatorische Aktivitäten :** TNF- α aktiviert Makrophagen, Neutrophile und Eosinophile genau so wie endotheliale Zellen (die die prokoagulative Aktivität anzeigen). Es reguliert die Produktion von Antikörpern durch B-Zellen und stimuliert die zytotoxischen T-Zellen. Es induziert die Produktion verschiedener anderer inflammatorischer Mediatoren wie IL-1, IL-6, Kolonie-stimulierende Faktoren, Prostaglandine, Platelet-Activating Factor (PAF), Kollagenasen etc.
- **Metabolische Aktivitäten :** TNF- α hemmt stark die Lipoproteinlipase und die genetische Expression von Adipozyten

B. Klinische Anwendungen

TNF- α spielt eine große pathogene Rolle : bei der Kachexie einhergehend mit chronischen Infektionen oder karzinogenen Erkrankungen, beim septischen Schock, wobei die Neutralisation von TNF- α gegen eine drohende akute Lethalität schützt, bei der Abstoßung von Transplantaten sowie der GVH-Erkrankung und bei parasitären Erkrankungen, wobei TNF- α einen gewissen Schutz bietet, aber auch schwerere Formen der Krankheit fördern kann (z.B. die zerebrale Form der Malaria). TNF- α , das oft in Kombination mit anderen Zytokinen auftritt, ist ebenso in verschiedene Autoimmunerkrankungen und sogar in der Pathogenese der Arteriosklerose involviert. Abnormal hohe Serumwerte von TNF- α wurden beim septischen Schock, bei der Abstoßung von Transplantaten, Infektionen durch Parasiten, Krebs, nach Hämofiltration und während der *in vivo* Therapie mit Zytokinen (IL-2) usw. beschrieben. Neben eines Verständnisses für die Pathogenese können diese Bestimmungen Hilfe bei der Diagnose leisten (z.B. bei der Abstoßung von Transplantaten) und haben eine prognostische Bedeutung (z.B. bei systemischen Infektionen).

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DIASource TNF- α -EASIA ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay (EASIA) im Mikrotiterplattenformat. Der Assay benutzt monoklonale Antikörper (MAbs), die gegen verschiedene Epitope von TNF- α gerichtet sind. Kalibratoren und Proben reagieren mit dem primären monoklonalen Antikörper (MAK 1), mit dem die Wells der Mikrotiterplatte beschichtet sind, und mit einem monoklonalen Antikörper (MAK 2), der mit Meerrettich-Peroxidase (MRP) markiert ist. Nach einer Inkubationsphase bildet sich ein Sandwich-Komplex: MAK 1 - TNF- α - MAK 2 - MRP; nicht gebundene enzymbeschriftete Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Gebundene enzymbeschriftete Antikörper werden durch eine Farbreaktion gemessen. Farblösung (TMB – H₂O₂) wird hinzugefügt und inkubiert. Die Reaktion wird durch Hinzufügen einer Stopplösung beendet und die Mikrotiterplatte wird bei adäquater Wellenlänge ausgewertet. Die Menge an Substratumsatz wird kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die proportional zur TNF- α -Konzentration ist. Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die TNF- α -Konzentration in den Proben wird durch Interpolation von der Kalibrationskurve bestimmt. Die Verwendung des EASIA-Lesegeräts (Linearität bis zu 3 OD-Einheiten) und eine komplexe Datenreduktionsmethode (polychromatische Datenreduktion) ergeben eine hohe Sensibilität im niedrigen Bereich und einen breiten Kalibrationsbereich.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien		96 Test Kit	Farb-Code	Rekonstitution
 Mikrotiterplatte mit 96 anti TNF-α - beschichtete Wells (monoklonale Antikörper)		96 Wells	Blau	gebrauchsfertig
Ab HRP Konjugat: MRP beschriftete Anti-TNF-α (monoklonale Antikörper) in TRIS-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin und Thymol		1 Gefäß 0,75 ml	Rot	Konjugatpuffer zugeben (beachten sie Abschnitt VII)
CAL 0 Null-Kalibrator in Humanserum mit Benzamidin und Thymol		2 Gefäße lyophilisiert	Gelb	Dest. Wasser zugeben (das exakte Volumen bitte dem Etikett entnehmen)
CAL N Kalibrator - N = 1 bis 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanserum mit Benzamidin und Thymol		5 Gefäße lyophilisiert	Gelb	2 ml dest. Wasser zugeben
CONJ BUF Konjugatpuffer: TRIS-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin, EDTA und Thymol		1 Gefäß 6 ml	Rot	gebrauchsfertig
INC BUF Inkubationspuffer: TRIS-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin, EDTA und Thymol		1 Gefäß 6 ml	Schwarz	gebrauchsfertig
WASH SOLN CONC Waschlösung (Tris-HCl)		1 Gefäß 10 ml	Braun	200 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
CONTROL N Kontrollen - N = 1 oder 2 Humanserum mit Thymol		2 Gefäße lyophilisiert	Silber	2 ml dest. Wasser zugeben
CHROM TMB CONC Chromogenes TMB (Tetramethylbenzidin) in Dimethylformamid		1 Gefäß 1 ml	Grün	0,2 ml in 1 Fläschchen Substratpuffer verdünnen
SUB BUF Substratpuffer: H₂O₂ in Azetat-/Zitratpuffer		3 Gefäße 21 ml	Weiß	gebrauchsfertig
STOP SOLN Stopplösung: H₂SO₄ 1,8N		1 Gefäß 6 ml	Schwarz	gebrauchsfertig

Bemerkung: 1. Benutzen Sie den Null-Kalibrator zur Probenverdünnung.
2. 1 pg der Kalibratorzubereitung ist äquivalent zu 40 mU des NIBSC IS 87/650.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

- Hochwertiges destilliertes Wasser
- Pipetten: 50 μ l, 200 μ l, 1 ml und 10 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegplastikspitzen wird empfohlen)
- Vortex Mixer
- Magnetrührer
- Horizontaler Schüttler für Mikrotiterplatte Kap. 700 rpm $\pm$ 100 rpm
- Waschgerät für Mikrotiterplatten
- Mikrotiterplatten-Lesegerät zur Auswertung bei 450 nm, 490 nm und 650 nm (bei polychromatischer Auswertung) oder zur Auswertung bei 450 nm und 650 nm (monochromatische Auswertung)
- Optional: ELISA-AID™ zur Auswertung der Platte nach polychromatischer Methode (siehe Abschnitt XI.A.), erhältlich bei Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. **Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie den Null-Kalibrator bis zu dem genau auf dem Etikett des Fläschchens angegebenen Volumen mit dest. Wasser und die anderen Kalibratoren mit 2 ml dest. Wasser.
- B. **Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 2 ml dest. Wasser.
- C. **Konjugatlösung :** der Anzahl der benutzten Vertiefungen folgend, verdünnen sie das konzentrierte Konjugat mit dem Konjugatpuffer in einem sauberen Glasröhrchen: die zu pipettierenden Volumina entnehmen sie unten stehender Tabelle. Frisch herstellen wird empfohlen Das verdünnte Konjugat ist maximal eine Woche bei 2-8°C stabil.

TABELLE KONJUGATVERDÜNNUNG

Anzahl der Vertiefungen	Konzentriertes Konjugat	Konjugatpuffer	Arbeitsvolumen
8	50 μ l	500 μ l	550 μ l
16	100 μ l	1000 μ l	1100 μ l
24	150 μ l	1500 μ l	1650 μ l
32	200 μ l	2000 μ l	2200 μ l
48	300 μ l	3000 μ l	3300 μ l
96	600 μ l	6000 μ l	6600 μ l

- D. **Waschlösung:** Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (200x) mit 199 Anteilen dest. Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Werfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages weg.
- E. **Substratlösung:** Pipettieren Sie 0,2 ml chromogenes TMB in eine der Fläschchen Substratpuffer (H₂O₂ in Azetat-/Zitratpuffer). Frisch herstellen.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- § Vor dem Öffnen oder der Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2°C bis 8°C stabil.
- § Nicht verwendete Mikrotiterstreifen sollten bis zum Verfallsdatum dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2° bis 8°C gelagert werden.
- § Nach der Rekonstitution sind die Kalibratoren und Kontrollen bei 2°C bis 8°C 4 Tage stabil. Aliquots müssen bei längerer Aufbewahrung bei -20°C eingefroren werden, dann sind Sie 2 Monate haltbar. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- § Die konzentrierte Waschlösung ist bei Raumtemperatur bis zum Verfallsdatum haltbar.
- § Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- § Nach der ersten Benutzung ist das Konjugat bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2° bis 8° C bis zum Ablaufdatum stabil.
- § Die frisch hergestellte Substratlösung ist vor Gebrauch bei Raumtemperatur höchstens 15 Minuten stabil und ist danach zu entsorgen.
- § Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- § Das Serum muss so schnell wie möglich vom Blutgerinnell der roten Zellen nach Gerinnung und Zentrifugation getrennt und bei 4°C aufbewahrt werden. Werden die Proben nicht direkt benutzt, müssen sie bei -70°C für maximal 1 Jahr gelagert werden.
- § Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

- § Vor Gebrauch müssen alle Proben Raumtemperatur erreichen. Vortexmischen der Proben wird vor Gebrauch empfohlen.
- § Die Bedingungen der Probenahme können Werte beeinflussen, weshalb strenge Vorsichtsmaßnahmen während des Sammelns ergriffen werden müssen, um Unreinheiten im gesammelten Material, die die TNF- α Produktion durch Blutzellen stimulieren und somit Serum TNF- α Werte fälschlich steigern könnten, zu vermeiden.
- § Sammelröhrchen dürfen kein Pyrogen enthalten.

X. DURCHFÜHRUNG

A. Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum.

Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur. Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.

Führen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben doppelt aus. Vertikale Ausrichtung wird empfohlen.

Verwenden Sie zur Zubereitung der Waschlösung reinen Kunststoffbehälter.

Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.

Verwenden Sie zur Pipettierung der Substratlösung und der Stopplösung keine Pipetten mit Metallteilen.

Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.

Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.

Zur Vermeidung von Drift muss die Zeit zwischen dem Pipettieren des ersten Kalibrators und der letzten Probe auf die Zeit beschränkt werden, die in Abschnitt XIII Absatz E (Zeitverzögerung) erwähnt wird.

Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

Pipettieren Sie die Substratlösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte.

Während der Inkubation mit der Substratlösung ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

B. Durchführung

- Wählen Sie die erforderliche Anzahl der Streifen für den Lauf aus. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen sollten wieder dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2° bis 8°C gelagert werden.
- Befestigen Sie die Streifen im Halterahmen.
- Pipettieren Sie 50 µl Inkubationspuffer in alle Wells.
- Pipettieren Sie jeweils 200 µl Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Wells.
- Inkubieren Sie 2 Stunden bei Raumtemperatur auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm.
- Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
- Waschen Sie die Platte dreimal:
 - § pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jeden Well
 - § saugen Sie der Inhalt jedes Wells ab
- Pipettieren Sie 100 µl Null-Kalibrator in alle Wells.
- Pipettieren Sie 50 µl Anti- TNF- α -MRP-Konjugat in alle Wells.
- Inkubieren Sie 2 Stunden bei Raumtemperatur auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm.
- Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
- Waschen Sie die Platte dreimal:
 - § pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jeden Well
 - § saugen Sie der Inhalt jedes Wells ab
- Pipettieren Sie 200 µl der frisch hergestellten Substratlösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jeden Well.
- Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 30 Minuten bei Raumtemperatur auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm; vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
- Pipettieren Sie 50 µl der Stopplösung in jeden Well.
- Werten Sie die Absorptionen bei 450 nm und 490 nm (Referenzfilter 630 nm oder 650 nm) innerhalb 3 Stunden aus und berechnen Sie die Resultate wie in Abschnitt XI beschrieben.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

A. Polychromatische Auswertung:

- In diesem Fall werden die Daten durch die ELISA-AID™ Software verarbeitet.
- Die Platte wird zunächst bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) ausgewertet.
- Eine zweite Auswertung erfolgt bei 490 nm gegen denselben Referenzfilter.
- Die ELISA-AID™ Software steuert das Lesegerät automatisch und integriert beide Auswertungen in ein polychromatisches Modell. Diese Technik kann ODs bis 10 erstellen.

- Das Prinzip der polychromatischen Datenauswertung funktioniert wie folgt:
 - § X_i = OD bei 450 nm
 - § Y_i = OD bei 490 nm
 - § Standard nicht gewichtet lineare Regression, Parameter A & B werden berechnet: $Y = A \cdot X + B$
 - § Wenn $X_i < 3$ OD Einheiten, dann X berechnet = X_i
 - § Wenn $X_i > 3$ OD Einheiten, dann X berechnet = $(Y_i - B) / A$
 - § Die Kalibrationskurve wird unter Verwendung einer 4 Parameter logistischen Kurve erstellt.
 - § Die TNF- α -Konzentration in den Proben wird durch Interpolation auf der Kalibrationskurve bestimmt.

B. Bichromatische Auswertung:

- Werten Sie die Platte bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) aus.
- Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
- Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration TNF- α (Abszisse) und zeichnen Sie eine Kalibrationskurve durch die Kalibrationspunkte, indem Sie die eingetragenen Punkte durch gerade Linien verbinden.
- Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Kalibrationskurve.
- Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer “4 Parameter”-Kurvenfunktion.

XII. TYPISCHE WERTE

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

TNF- α -EASIA		OD Einheiten Polychromatisches Modell
Kalibrator	0 pg/ml	0,045
	6,8 pg/ml	0,120
	18 pg/ml	0,259
	52 pg/ml	0,619
	176 pg/ml	1,435
	518 pg/ml	3,237

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen.

Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswert bei Nullbindung, entsprach 0,7 pg/ml.

B. Spezifität

Es wurde keine signifikante Kreuzreaktion beobachtet beim Vorhandensein von 50 ng von IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TNF- β , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TGF- β , GM-CSF, OSM , MIP-1 α , MIP-1 β , LIF, MCP-1, G-CSF und RANTES. Dieses TNF- α Assay ist spezifisch für humanes natürliches und rekombinantes TNF- α .

C. Präzision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A B	20	91 ± 6	6,6	A B	24	122 ± 5	4,5
	20	526 ± 33	6,3		24	431 ± 14	3,3

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST			
Probe	Zugew. TNF- α (pg/ml)	Wiedergef. TNF- α (pg/ml)	Wiedergefunden (%)
Serum 1	0	6,2	-
	38,4	43,3	97
	83,9	90,0	100
	188,3	192,5	99
	408,2	376,2	91

Serum 2	0	3,8	-
	38,4	45,5	108
	83,9	91,2	104
	188,3	162,2	84
	408,2	379,2	92

VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünn.	Theoret. Konzentr. (pg/ml)	Gemess. Konzentr. (pg/ml)
Serum 1	1	-	436,5
	2	218,3	212,4
	4	109,1	104,8
	8	54,6	59,5
	16	27,3	31,7
Serum 2	1	-	420,2
	2	210,1	211,2
	4	105,0	98
	8	52,5	58,3
	16	26,3	30,7

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im Folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann gewährleistet ist, wenn die Probe 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugegeben wird.

ZEITDIFFERENCE

	T0	30 min	45 min
SC1	202	183	222
SC2	506	520	565

XIV INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- § Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- § Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte. Kontrollen mit erhöhten Azidkonzentrationen stören die Enzymreaktion und können nicht verwendet werden.
- § Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.
- § Es wird empfohlen, Kontrollen im Assay routinemäßig wie unbekannte Proben zu behandeln, um die Assayvarianz zu messen. Die Leistung des Assay muss mit den Qualitätskontrollkarten der Kontrollen überprüft werden.
- § Es hat sich bewährt, die durch den Computer ausgewählte Kurvenanpassung visuell zu überprüfen.

XV. REFERENZINTERVALLE

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

Zur Orientierung: Die Ergebnisse von 30 Serumproben augenscheinlich gesunder Personen mit niedrigen CRP Werten, liegen innerhalb der Bandbreite von 4,6 und 12,4 pg/ml.

XIII. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in den USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit darüber liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde.

Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiös betrachtet werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit allen Reagenzien; Stopplösung enthält H₂SO₄, Farblösung enthält TMB in Dimethylformamid, Substratpuffer enthält H₂O₂. Bei Kontakt gründlich mit Wasser spülen.

Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und verwenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

XVII. LITERATUR

- BEUTLER B., CERAMI A. (1987)
Cachectin : more than a tumor necrosis factor.
N. Engl. J. Med., 316 ; 379-385.
- TRACEY K.J., FONG Y., HESSE D.G., MANOGUE K.R., LEE A.T., KUO G.C., LOWRY S.F. and CERAMI A. (1987)
Anti cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia.
Nature, 330 : 662-664.
- PIGUET P.F., GRAU G.E., ALLET B. and VASSALLI P. (1987)
Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-versus-host disease.
J. Exp. Med., 166 ; 1280-1289.
- AUKRUST P., LIABAKK N-B., MÜLLER F., LIEN E., ESPEVIK T. and FROLAND S.S. (1994)
Serum Levels of Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) and Soluble TNF Receptors in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection - Correlations to Clinical Immunologic, and Virologic Parameters.
J. Inf. Dis., 169:420-424.
- WAAGE A., HALSTENSEN A. and ESPEVIK T. (1987)
Association between tumor necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease.
Lancet, 1 ; 355-357.
- LEROUX-ROELS G., OFFNER F., PHILIPPE J. and VERMEULEN A. (1988)
Influence of Blood-Collecting Systems on Concentrations of Tumor Necrosis Factor in Serum and Plasma.
Clin. Chem., 34 ; 2373-2374.

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	KALIBRATOREN (µl)	PROBE(N) KONTROLLEN (µl)
Inkubationspuffer Kalibratoren (0-5) Proben, Kontrollen	50 200 -	50 - 200
2 Stunden bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren. Inhalt jedes Wells absaugen. Dreimal mit 400 µl Waschlösung waschen und absaugen.		
Null-Kalibrator Anti- TNF- α -MRP Konjugat	100 50	100 50
2 Stunden bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren. Inhalt jedes Wells absaugen. Dreimal mit 400 µl Waschlösung waschen und absaugen.		
Substratlösung	200	200
30 min. bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren.		
Stopplösung	50	50
Auf einem Mikrotiterplatten-Lesegerät auswerten und Absorption jedes Wells bei 450 nm (gg. 630 oder 650 nm) und 490 nm (gg. 630 oder 650 nm) vermerken.		

DIAsource Katalognummer : KAP1751	Beipackzettelnummer: 1700571/de	Nummer der Originalausgabe: 0090508/1
--------------------------------------	------------------------------------	---

Revisionsdatum : 2009-05-08

Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

TNF- α -EASIA

I. USO DEL KIT

Kit immunoenzimetrico per la determinazione quantitativa in vitro del Fattore di Necrosi Tumorale α umana (TNF- α) in siero.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIASource TNF- α EASIA Kit
- B. Numero di catalogo:** KAP1751 : 96 tests
- C. Prodotto da:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:
Tel: +32 (0) 67 88.99.99 Fax: +32 (0) 67 88.99.96

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche

Il Fattore di Necrosi Tumorale Alfa (TNF- α), altrimenti detto cachectina, è una citochina costituita da un polipeptide non-glicosilato di 157 aa, prodotto principalmente da macrofagi attivati (monociti). La componente lipopolisaccaridica (LPS) della parete cellulare di batteri gram-negativi (endotossina) agisce come potente stimolo alla produzione di TNF- α da parte dei macrofagi, inoltre il TNF- α è un importante mediatore dei ben noti effetti in vivo dell'LPS, quali necrosi emorragica dei tumori, febbre, shock e attivazione dei neutrofili. Le varie attività biologiche del TNF- α possono essere classificate come segue:

* *Attività antitumorali e regolatorie della crescita:* il TNF- α mostra una tossicità selettiva per cellule tumorali o infettate da virus. Per contro, ha effetto angiogenico e stimola la crescita di fibroblasti in coltura.

* *Attività immunomodulatorie e proinfiammatorie:* Il TNF- α attiva macrofagi, neutrofili ed eosinofili, nonché le cellule entoteliali (con attività procoagulante). Regola la produzione anticorpale dei linfociti B e stimola i linfociti T citotossici. Induce la produzione di molti altri mediatori dell'infiammazione, quali IL-1, IL-6, fattori stimolanti le colonie, prostaglandine, fattore attivante le piastrine (PAF), collagenasi ecc.

* *Attività metaboliche:* Il TNF- α inibisce fortemente la lipoproteina lipasi e l'espressione genica in adipociti.

B. Applicazione clinica

Il TNF- α riveste un ruolo patogenetico importante nella cachessia associata a malattie infettive croniche o cancerose, nello shock settico, dove la neutralizzazione del TNF- α protegge contro la letalità acuta ad esso associata, nel rigetto del trapianto e nella malattia del trapianto contro l'ospite, e nelle infezioni parassitarie nelle quali il TNF- α può fornire una protezione ma favorire anche l'insorgenza di forme più gravi della malattia (es. malaria cerebrale). Il TNF- α , spesso in associazione ad altre citochine, è coinvolto altresì in diverse malattie autoimmuni nonché nella patogenesi dell'arteriosclerosi. Un'anomala elevazione dei livelli sierici di TNF- α è stata evidenziata in associazione a shock settico, rigetto del trapianto, infezioni parassitarie, cancro, in fase post-emofiltrazione, durante terapia con citochine (IL-2) in vivo, ecc. Oltre a fornire informazioni utili riguardo alla patogenesi, tale determinazione potrebbe costituire un supporto diagnostico (es. in caso di rigetto del trapianto) ed avere un valore prognostico (es. nelle infezioni sistemiche).

IV. PRINCIPIO DEL METODO

DIAsource TNF- α -EASIA è un immunosaggio a sensibilità amplificata a fase solida eseguito su piastre di microtitolazione. Il dosaggio utilizza anticorpi monoclonali (Mabs) diretti contro epitopi distinti del TNF- α . I calibratori e i campioni reagiscono con la cattura dell’anticorpo monoclonale (MAb 1) che riveste il pozzetto di microtitolazione e con un anticorpo monoclonale (MAb 2) marcato con horseradish perossidasi (HRP). Dopo un periodo di incubazione che consenta la formazione di un sandwich; MAb 1 di rivestimento –TNF- α umana – MAb 2 – HRP, la piastra di microtitolazione viene lavata per rimuovere l’anticorpo marcato con enzima non legato. L’anticorpo marcato con enzima non legato viene misurato attraverso una reazione cromogenica. Si procede quindi con l’aggiunta della soluzione cromogena (TMB) e successiva incubazione. La reazione viene interrotta con l’aggiunta di Soluzione di arresto; quindi la piastra di microtitolazione viene letta alla lunghezza d’onda adeguata. La quantità di turnover del substrato viene determinata colorimetricamente misurando l’assorbanza che è proporzionale alla concentrazione di TNF- α . Viene tracciata una curva di calibrazione e la concentrazione TNF- α nei campioni viene determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione. L’utilizzo del lettore EASIA (linearità fino a 3 unità OD) associato all’impiego di un sofisticato metodo di riduzione dati (riduzione dati policromatica) garantisce un’elevata sensibilità nel range basso dei valori e un esteso range di calibrazione.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione
 Piastra di microtitolazione con 96 pozzetti , rivestiti anti TNF-α (anticorpi monoclonali)	96 pozzetti	Blu	Pronte per l'uso
Ab HRP Coniugato: anti- TNF-α (anticorpi monoclonali) marcato con HRP in tampone TRIS-maleato con albumina di siero bovino e timolo	1 flacone 0,75 ml	Rosso	Aggiungere il tampone del coniugato (vedi paragrafo VII)
CAL 0 Calibratore Zero: siero umano con benzamidina e timolo	2 flaconi liofiliz	Giallo	Aggiungere acqua distillata (vedi etichetta per volume esatto)
CAL N Calibratore N= 1-5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi) in siero umano con benzamidina e timolo.	5 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 2 ml di acqua distillata
CONJ BUF Tampone del coniugato: tampone TRIS-maleato con albumina di siero bovino, EDTA e timolo.	1 flacone 6 ml	Rosso	Pronte per l'uso
INC BUF Tampone di incubazione: tampone TRIS-maleato con albumina di siero bovino, EDTA e timolo	1 flacone 6 ml	Nero	Pronte per l'uso
WASH SOLN CONC Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	1 flacone 10 ml	Bruno	Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico).
CONTROL N Controlli: N = 1 o 2, in siero umano e timolo	2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 2 ml di acqua distillata
CHROM TMB CONC Soluzione Cromogena TMB (tetrametilbenzidina in Dimetilformammide	1 flacone 1 ml	Verde	Diluire 0,2 ml in un flacone di tampone del substrato
SUB BUF Tampone del substrato: H₂O₂ in tampone acetato/citrato	3 flaconi 21 ml	Bianco	Pronte per l'uso
STOP SOLN Soluzione di arresto: H₂SO₄ 1.8N	1 flacone 6 ml	Nero	Pronto per l'uso

Note: 1. Usare lo Calibratore Zero per diluire i campioni.
2. 1 pg della preparazione standard è equivalente a 40 mIU del NIBSC IS 87/650.

VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

1. Acqua distillata di qualità elevata
2. Pipette per dispensare 50 μ l, 200 μ l, 1 ml e 10 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Agitatore tipo vortex.
4. Agitatore magnetico.
5. Agitatore orizzontale per micropiastre da 700 $\pm$ 100 rpm
6. lavatrice per piastra di microtitolazione
7. Lettore di micropiastre per letture a 450, 490 e 650 nm (in caso di lettura policromatica) o per letture a 450 e 650 nm (in caso di lettura bicromatica).
8. Strumentazione aggiuntiva: l’ ELISA-AID™ necessario per la lettura policromatica delle piastre (vedi paragrafo XI.A) è acquistabile presso Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. Calibratore:** Ricostituire il calibratore zero con acqua distillata fino al volume indicato sull’etichetta del flacone e gli altri calibratori con 2 ml di acqua distillata.
- B. Controlli:** Ricostituire i controlli con 2 ml di acqua distillata.
- C. Coniugato Anti-TNF- α -HRP :** Sulla base del numero di pozzetti da utilizzare, diluire il coniugato concentrato con il tampone del coniugato in un flacone di vetro pulito: vedi la tabella qui di seguito per i volumi da pipettare. Si raccomanda la preparazione estemporanea. Il coniugato diluito mantiene la stabilità per un massimo di una settimana a 2-8°C.

TABELLA DI DILUIZIONE DEL CONIUGATO

Numero di pozzetti	Coniugato concentrato	Tampone del coniugato	Volume di lavoro
8	50 μ l	500 μ l	550 μ l
16	100 μ l	1000 μ l	1100 μ l
24	150 μ l	1500 μ l	1650 μ l
32	200 μ l	2000 μ l	2200 μ l
48	300 μ l	3000 μ l	3300 μ l
96	600 μ l	6000 μ l	6600 μ l

- D. Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 199 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (200x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.
- E. Soluzione di Rivelazione:** pipettare 0,2 ml di soluzione cromogena TMB in uno dei flaconi del tampone del substrato (H₂O₂ in tampone acetato/citrato). Si raccomanda la preparazione estemporanea.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- § I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- § Le strisce reattive inutilizzate devono essere conservate a 2-8°C, in un contenitore sigillato che contenga un essiccante fino alla data di scadenza.
- § Dopo la ricostituzione, i calibratori, i controlli sono stabili 4 giorni a 2-8°C. Per periodi di conservazione molto lunghi, preparare e mantenere le aliquote a –20°C per un massimo di 2 mesi. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- § La soluzione di lavaggio concentrata è stabile a temperatura ambiente fino alla data di scadenza.
- § La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- § Dopo apertura del flacone, il coniugato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull’etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- § La soluzione di rivelazione preparata di fresco rimane stabile prima dell’uso per un massimo di 15 minuti a temperatura ambiente. Superato tale limite dovrà essere eliminata.
- § Alterazioni dell’aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- § A coagulazione e centrifugazione avvenute, il siero dovrà essere rimosso al più presto dal coagulo di eritrociti e conservato a 4°C. In caso di utilizzo non immediato, dovranno essere conservati a -20°C per 2 mesi al massimo e a -70°C per un tempo maggiore (massimo un anno).
- § Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- § Prima dell’impiego, tutti i campioni devono essere a temperatura ambiente. Si raccomanda di vortexare i campioni prima di utilizzarli.

- § Le condizioni di raccolta possono influenzare i valori. Adottare pertanto le massime precauzioni durante la raccolta per evitare che eventuali impurità contenute nei campioni possano stimolare la produzione di TNF-α da parte delle cellule ematiche con conseguente aumento falsato dei livelli sierici di TNF-α.
- § Le provette di raccolta devono essere apirogene.

X. METODO DEL DOSAGGIO

A. Avvertenze generali

Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza.
Non mescolare reattivi di lotti diversi.
Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.
Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione.
Eseguire calibratori, controlli e campioni in doppio. Si raccomanda l'allineamento verticale.
Utilizzare un contenitore di plastica pulito per preparare la soluzione di lavaggio.
Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.
Per la distribuzione della Soluzione di Rivelazione e la Soluzione di arresto evitare pipette con parti metalliche.
L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio.
Rispettare i tempi di incubazione.
Per evitare derive, l'intervallo tra il pipettaggio del primo calibratore e l'ultimo campione deve essere limitato ai tempi riportati nella sezione XIII, paragrafo E (Tempo Trascorso).
Allestire una curva di calibrazione per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di calibrazione di sedute analitiche precedenti.
La Soluzione di Rivelazione deve essere incolore. L'eventuale sviluppo di un colore blu entro pochi minuti dalla preparazione indica che il reagente è inutilizzabile e deve essere eliminato.
Distribuzione della Soluzione di Rivelazione entro 15 minuti dopo il lavaggio della piastra di microtitolazione.
Durante l'incubazione con la Soluzione di Rivelazione evitare la luce diretta del sole sulla piastra di microtitolazione.

B. Metodo del dosaggio

- Selezionare il numero di strisce reagenti necessario per il test. Le strisce reagenti inutilizzate devono essere risigillate nel contenitore con un essiccante e conservate a 2-8°C.
- Assicurare le strisce reagenti nel telaio di supporto.
- Pipettare 50 µl di Tampone di Incubazione in ogni pozzetto
- Pipettare 200 µl di ogni calibratore, controllo e campione nei pozzetti adeguati.
- Incubare per 2 ore a temperatura ambiente su agitatore orizzontale regolato a 700 ± 100 rpm.
- Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
- Lavare la piastra 3 volte :
§ versando 0,4 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
§ aspirando il contenuto di ogni pozzetto
- Pipettare 100 µl del calibratore zero in tutti i pozzetti.
- Pipettare 50 µl di coniugato anti- TNF-α –HRP in tutti i pozzetti.
- Incubare per 2 ore a temperatura ambiente su agitatore orizzontale regolato a 700 ± 100 rpm.
- Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
- Lavare la piastra 3 volte :
§ versando 0,4 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
§ aspirando il contenuto di ogni pozzetto
- Pipettare 200 µl della soluzione di rivelazione preparata di fresco in ogni pozzetto entro 15 minuti dal termine della fase di lavaggio.
- Incubare la piastra di microtitolazione per 30 minuti a temperatura ambiente su un agitatore orizzontale a 700 ± 100 rpm; evitare la luce diretta del sole.
- Pipettare 50 µl di soluzione di arresto in ogni pozzetto.
- Leggere le assorbanze a 450 nm a 490 nm (filtro di riferimento a 630 nm o 650 nm) entro 3 ore e calcolare i risultati come descritto nella sezione XI.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

A. Lettura policromatica:

- In questo caso, l'elaborazione dati verrà effettuata dal software ELISA-AID™.
- La piastra viene letta a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
- Verrà quindi effettuata una seconda lettura a 490 nm rispetto allo stesso filtro di riferimento.
- Il Software ELISA-AID™ guiderà automaticamente il lettore e integrerà le due letture utilizzando un modello policromatico. Tale tecnica può generare valori fino a 10 OD.
- Il principio dell'elaborazione policromatica dei dati è la seguente:
* Xi = OD a 450 nm
* Yi = OD a 490 nm

- * Utilizzando una regressione lineare standard non pesata, i parametri A & B sono calcolati: $Y = A \cdot X + B$
- * Se $X_i < 3$ unità OD, X calcolato = X_i
- * Se $X_i > 3$ unità OD, X calcolato = $(Y_i - B) / A$
- * Per tracciare la curva di calibrazione viene utilizzato un modello di adattamento della curva logistica a 4 parametri.
- * La concentrazione di TNF-α nel campione viene determinata per interpolazione sulla curva di calibrazione.

B. Lettura bicromatica

- Leggere la piastra a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
- Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
- Costruire la curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica o lineare ponendo in ordinata le medie dei colpi per minuto (cpm) dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di TNF-α, collegando i punti tracciati con linee rette.
- Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
- E' possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I dati qui di seguito riportati sono esclusivamente indicativi e non dovranno assolutamente essere utilizzati in sostituzione della curva di calibrazione tracciata in tempo reale.

TNF-α -EASIA		Unità OD
		Modello policromatico
Calibratore	0 pg/ml	0,045
	6,8 pg/ml	0,120
	18 pg/ml	0,259
	52 pg/ml	0,619
	176 pg/ml	1,435
	518 pg/ml	3,237

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Venti replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard. La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con OD pari alla media più 2 deviazioni standard di 20 replicati dello standard zero, è risultata essere 0,7 pg/ml.

B. Specificità

Nessuna reazione crociata significativa è stata osservata in presenza di 50 ng di IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TNF-β, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, TGF-β, GM-CSF, OSM, MIP-1α, MIP-1β, LIF, MCP-1, G-CSF e RANTES. Tale test per il dosaggio del TNF-α è specifico per il TNF-α naturale e ricombinante umano.

C. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	20	91 ± 6	6,6	A	24	122 ± 5	4,5
B	20	526 ± 33	6,3	B	24	431 ± 14	3,3

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI RECUPERO

Campione	TNF-α aggiunta (pg/ml)	TNF-α recuperata (pg/ml)	Recupero (%)
Siero 1	0	6,2	-
	38,4	43,3	97
	83,9	90,0	100
	188,3	192,5	99
	408,2	376,2	91
Siero 2	0	3,8	-
	38,4	45,5	108
	83,9	91,2	104
	188,3	162,2	84
	408,2	379,2	92

TEST DI DILUIZIONE

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (pg/ml)	Concentrazione misurata (pg/ml)
Siero 1	1	-	436,5
	2	218,3	212,4
	4	109,1	104,8
	8	54,6	59,5
	16	27,3	31,7
Siero 2	1	-	420,2
	2	210,1	211,2
	4	105,0	98
	8	52,5	58,3
	16	26,3	30,7

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

E. Tempo trascorso tra l'aggiunta dell'ultimo calibratore e il campione

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 30 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

	T0	30 min	45 min
SC1	202	183	222
SC2	506	520	565

XIV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- § Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- § Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. I controlli che contengono azide interferiscono con la reazione enzimatica e quindi non possono essere utilizzati.
- § I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.
- § Si raccomanda di saggiare i controlli con regolarità come campioni sconosciuti per misurare la variabilità del saggio. La resa del saggio deve essere monitorata con tabelle di controllo qualità dei controlli.
- § È buona pratica verificare visivamente il modello di curva selezionato dal computer.

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori vengono dati solo come guida; ogni laboratorio deve stabilire i propri intervalli normali di valori.

Come riferimento, i risultati di 30 campioni di siero appartenenti a soggetti apparentemente sani con bassi livelli di PCR, hanno mostrato valori interni al range 4,6 – 12,4 pg/ml.

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.

Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare qualsiasi contatto della cute con tutti i reagenti, la Soluzione di Arresto contiene H₂SO₄, la soluzione cromogena contiene TMB in Dimetilformammide, il tampone del substrato contiene H₂O₂.

In caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua.

Non fumare, bere, mangiare o applicare cosmetici nell'area di lavoro. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Utilizzare indumenti protettivi e guanti monouso.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- BEUTLER B., CERAMI A. (1987)
Cachectin : more than a tumor necrosis factor.
N. Engl. J. Med., 316 ; 379-385.
- TRACEY K.J., FONG Y., HESSE D.G., MANOGUE K.R., LEE A.T., KUO G.C., LOWRY S.F. and CERAMI A. (1987)
Anti cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia.
Nature, 330 : 662-664.
- PIGUET P.F., GRAU G.E., ALLET B. and VASSALLI P. (1987)
Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-versus-host disease.
J. Exp. Med., 166 ; 1280-1289.
- AUKRUST P., LIABAKK N-B., MÜLLER F., LIEN E., ESPEVIK T. and FROLAND S.S. (1994)
Serum Levels of Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) and Soluble TNF Receptors in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection - Correlations to Clinical Immunologic, and Virologic Parameters.
J. Inf. Dis., 169:420-424.
- WAAGE A., HALSTENSEN A. and ESPEVIK T. (1987)
Association between tumor necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease.
Lancet, 1 ; 355-357.
- LEROUX-ROELS G., OFFNER F., PHILIPPE J. and VERMEULEN A. (1988)
Influence of Blood-Collecting Systems on Concentrations of Tumor Necrosis Factor in Serum and Plasma.
Clin. Chem., 34 ; 2373-2374.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	CALIBRATORE (µl)	CAMPIONI CONTROLLI (µl)
Tampone di Incubazione	50	50
Calibratore (0 - 5)	200	-
Campioni, controlli	-	200
Incubare per 2 ore a temperatura ambiente in agitazione continua a 700 rpm. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 400 µl di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Calibratore Zero	100	100
Coniugato Anti-TNF- α - HRP	50	50
Incubare per 2 ore a temperatura ambiente in agitazione continua a 700 rpm. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 400 µl di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Soluzione di Rivelazione	200	200
Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente in agitazione continua a 700 rpm.		
Soluzione di arresto	50	50
Leggere su un lettore per piastra da microtitolazione e registrare l'assorbanza di ogni pozzetto a 450 nm (e 490 nm) rispetto a 630 (o 650 nm)		

Numero di catalogo di DIASource: KAP1751	P.I. numero: 1700571/it	Revisione numero: 090508/1
--	----------------------------	-------------------------------



Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

TNF- α -EASIA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ανοσοενζυμομετρικός προσδιορισμός για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση του ανθρώπινου παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNF- α) σε ορό.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. **Εμπορική ονομασία:** Κιτ TNF- α -EASIA της DIAsource
- B. **Αριθμός καταλόγου:** KAP1751: 96 προσδιορισμοί
- Γ. **Κατασκευάζεται από την:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)67 88.99.99 Φαξ: +32 (0)67 88.99.96

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Βιολογική δράση

Ο άνθρωπος παράγοντας νέκρωσης όγκων άλφα (TNF- α) ή αλλιώς καχεκτίνη, είναι μία κυτταροκίνη μη γλυκοζυλιωμένου πολυπεπτιδίου 157 αμινοξέων, που παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα μακροφάγα (μονοκύτταρα). Οι λιποπυλινικές ουσίες (LPS), το συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης αρνητικών κατά gram βακτηριδίων (ενδοτοξίνη), αποτελούν ισχυρό ερέθισμα για την παραγωγή TNF- α από μακροφάγα. Ο TNF- α είναι ένας σημαντικός μεσολαβητής των ευρέως γνωστών *in vivo* επιδράσεων των LPS, όπως αιμορραγική νέκρωση όγκων, πυρετός, σοκ και ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων. Οι ποικίλες βιολογικές δράσεις του TNF- α μπορούν να καταταγούν ως εξής :

- *Αντικαρκινικές και ρυθμιστικές της ανάπτυξης δράσεις:* Ο TNF- α εμφανίζει εκλεκτική τοξικότητα κατά νεοπλασματικών κυττάρων ή κυττάρων προσβεβλημένων από ιούς. Αντίστροφα, έχει αγγειογενετική δράση και διεγείρει την ανάπτυξη ινοβλαστών σε καλλιέργειες.
- *Ανοσορυθμιστικές και προφλεγμονώδεις δράσεις:* Ο TNF- α ενεργοποιεί μακροφάγα, ουδετερόφιλα και ηωσινόφιλα, καθώς και ενδοθηλιακά κύτταρα (τα οποία εμφανίζουν προπηκτική δράση). Ρυθμίζει την παραγωγή αντισωμάτων από B-κύτταρα και διεγείρει κυτταροτοξικά T-κύτταρα. Επάγει την παραγωγή αρκετών ακόμη μεσολαβητών φλεγμονής, π.χ. IL-1, IL-6, παράγοντες διέγερσης αποικιών, προσταγλανδίνες, παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF), κολλαγενάσες κτλ.
- *Μεταβολικές δράσεις :* Ο TNF- α είναι ισχυρός καταστολέας της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης και της γονιδιακής έκφρασης λιποκυττάρων.

B. Κλινικές εφαρμογές

Ο TNF- α έχει προεξάρχοντα παθογόνο ρόλο στην καχεξία χρόνιων λοιμώξεων ή νεοπλασιών, στο σηπτικό σοκ όπου η εξουδετέρωση του TNF- α προστατεύει από τη σχετιζόμενη με αυτόν οξεία θνησιμότητα, στην απόρριψη μοσχεύματος, στη νόσο μοσχεύματος έναντι του ξενιστή και στις παρασιτικές λοιμώξεις, όπου ο TNF- α ενδεχομένως παρέχει κάποια προστασία, ευνοεί ωστόσο πιο βαριές μορφές της νόσου (π.χ. την εγκεφαλική μορφή της ελονοσίας). Ο TNF- α εμπλέκεται, συχνά σε συνδυασμό με άλλες κυτταροκίνες, σε αρκετές αυτοάνοσες νόσους, ακόμη και στην παθογένεση της αρτηριοσκλήρυνσης. Παθολογικά υψηλά επίπεδα TNF- α στον ορό έχουν αναφερθεί σε σηπτικό σοκ, απόρριψη μοσχεύματος, παρασιτικές λοιμώξεις, καρκίνο, μετά από αιμοκάθαρση, κατά τη διάρκεια *in vivo* θεραπείας με κυτταροκίνη (IL-2) κτλ. Εκτός από την καλύτερη κατανόηση της παθογένεσης, οι προσδιορισμοί αυτοί μπορούν ενδεχομένως να βοηθήσουν στη διαδικασία διάγνωσης (π.χ. στην απόρριψη μοσχεύματος) και έχουν προγνωστική αξία (π.χ. σε συστηματικές λοιμώξεις).

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο προσδιορισμός TNF-α-EASIA της DIAsource είναι ένας ενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός ενισχυμένης ευαισθησίας, στερεής φάσης, ο οποίος εκτελείται σε πλάκες μικροτιτλοδότησης. Ο προσδιορισμός χρησιμοποιεί μονοκλωνικά αντισώματα (MABs) που κατευθύνονται εναντίον διακριτών επιτόπων του TNF-α. Οι βαθμονομητές και τα δείγματα αντιδρούν με το μονοκλωνικό αντίσωμα σύλληψης (MAB 1) που είναι επιστρωμένο στην υποδοχή της πλάκας μικροτιτλοδότησης και με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα (MAB 2) σηματοδοτούμενο με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP). Μετά από μια περίοδο επώασης που επιτρέπει το σχηματισμό ενός σάντουιτς: επιστρωμένο MAB 1 – ανθρώπινος TNF-α – MAB 2 – HRP, η πλάκα μικροτιτλοδότησης υποβάλλεται σε πλύση για να απομακρυνθεί το σηματοδοτούμενο με ένζυμο αδέσμευτο αντίσωμα. Το σηματοδοτούμενο με ένζυμο δεσμευμένο αντίσωμα μετράται μέσω μιας χρωμογόνου αντίδρασης. Προστίθεται και επώάζεται χρωμογόνο διάλυμα (TMB έτοιμο για χρήση). Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη ανασχετικού διαλύματος και στη συνέχεια γίνεται ανάγνωση της πλάκας μικροτιτλοδότησης στο κατάλληλο μήκος κύματος. Η ποσότητα μετατροπής του υποστρώματος καθορίζεται χρωματομετρικά μετρώντας την απορρόφηση, η οποία είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση του TNF-α. Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζεται η συγκέντρωση του TNF-α στα δείγματα με αγωγή από την καμπύλη βαθμονόμησης. Η χρήση του συστήματος ανάγνωσης EASIA (γραμμικότητα έως 3 μονάδες OD) και μιας πολύπλοκης μεθόδου αγωγής δεδομένων (αγωγή πολυχρωματικών δεδομένων) έχουν ως αποτέλεσμα υψηλή ευαισθησία στο χαμηλό πεδίο τιμών και στο εκτεταμένο πεδίο τιμών βαθμονόμησης.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 προσδιορισμών	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση			
 Πλάκα μικροτιτλοδότησης με 96 υποδοχές επιστρωμένες με αντι TNF-α (μονοκλωνικά αντισώματα)	96 υποδοχές	μπλε	Έτοιμο για χρήση			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>HRP</td></tr></table> Σύζευγμα: Αντι-TNF-α (μονοκλωνικά αντισώματα) σηματοδοτούμενα με HRP σε ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-Maleate με βόεια ορολευκωματίνη και θυμόλη	Ab	HRP	1 φιαλίδιο 0,75 ml	κόκκινο	Προσθέστε ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος (βλ. ενότητα VII)	
Ab	HRP					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Μηδενικός βαθμονομητής σε ανθρώπινο ορό, βενζαμιδίνη και θυμόλη	CAL	0	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε απεσταγμένου νερού (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων)	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Βαθμονομητής N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο ορό, βενζαμιδίνη και θυμόλη	CAL	N	5 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε 2 ml απεσταγμένου νερού	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>CONJ</td><td>BUF</td></tr></table> Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος: Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-Maleate με βόεια ορολευκωματίνη, EDTA και θυμόλη	CONJ	BUF	1 φιαλίδιο 6 ml	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση	
CONJ	BUF					
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης: Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-Maleate με βόεια ορολευκωματίνη, EDTA και θυμόλη	INC	BUF	1 φιαλίδιο 6 ml	μαύρο	Έτοιμο για χρήση	
INC	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Διάλυμα πλύσης (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 200 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο ορό με θυμόλη	CONTROL	N	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	ασημί	Προσθέστε 2 ml απεσταγμένου νερού	
CONTROL	N					
<table border="1"><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td><td>CONC</td></tr></table> Χρωμογόνος TMB (τετραμεθυλβενζιδίνη) σε διμεθυλφορμαμίδη	CHROM	TMB	CONC	1 φιαλίδιο 1 ml	πράσινο	Αραιώστε 0,2 ml σε 1 φιαλίδιο ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος
CHROM	TMB	CONC				

<table><tr><td>SUB</td><td>BUF</td></tr></table> Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος: H₂O₂ σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών/κιτρικών	SUB	BUF	3 φιαλίδια 21 ml	λευκό	Έτοιμο για χρήση
SUB	BUF				
<table><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> Ανασχετικό αντιδραστήριο: H₂SO₄ 1,8N	STOP	SOLN	1 φιαλίδιο 6 ml	μαύρο	Έτοιμο για χρήση
STOP	SOLN				

Σημείωση: 1.Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις δειγμάτων.
2. 1 pg του παρασκευάσματος του βαθμονομητή είναι ισοδύναμο με 40 mIU του NIBSC IS 87/650.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

- Απεσταγμένο νερό υψηλής ποιότητας
- Πιπέτες για διανομή: 50 μl, 200 μl, 1 ml και 10 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
- Αναμείκτης στροβιλισμού
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Οριζόντια συσκευή ανάδευσης πλακών μικροτιτλοδότησης με δυνατότητα 700 rpm ± 100 rpm
- Συσκευή πλύσης για πλάκες μικροτιτλοδότησης
- Συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης με δυνατότητα ανάγνωσης στα 450 nm, 490 nm και 650 nm (σε περίπτωση πολυχρωματικής ανάγνωσης) ή με δυνατότητα ανάγνωσης στα 450 nm και 650 nm (διχρωματική ανάγνωση)
- Προαιρετικός εξοπλισμός: Ο εξοπλισμός ELISA-AID™ που είναι απαραίτητος για την πολυχρωματική ανάγνωση (δείτε την παράγραφο XI.A.) μπορεί να αγοραστεί από την Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. **Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε το μηδενικό βαθμονομητή στον όγκο που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου με απεσταγμένο νερό και άλλους βαθμονομητές με 2 ml απεσταγμένου νερού.
- B. **Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 2 ml απεσταγμένου νερού.
- Γ. **Διάλυμα συζεύγματος:** σύμφωνα με τον αριθμό των υποδοχών που θα χρησιμοποιηθούν, αραιώστε το συμπυκνωμένο σύζευγμα με το ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος σε ένα καθαρό γυάλινο φιαλίδιο: βλ. παρακάτω πίνακα για τους όγκους διανομής με πιπέτα. Συνιστάται αυτοσχέδια προετοιμασία. Το διαλυμένο σύζευγμα παραμένει σταθερό έως και 1 εβδομάδα στους 2-8°C.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΡΑΙΩΣΗΣ ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΟΣ

Αριθμός υποδοχών	Συμπυκνωμένο σύζευγμα	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος	Όγκος εργασίας
8	50 μl	500 μl	550 μl
16	100 μl	1000 μl	1100 μl
24	150 μl	1500 μl	1650 μl
32	200 μl	2000 μl	2200 μl
48	300 μl	3000 μl	3300 μl
96	600 μl	6000 μl	6600 μl

- Δ. **Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 199 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (200x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.
- Ε. **Αποκαλυπτικό διάλυμα:** Διανεύμετε με πιπέτα 0,2 ml της χρωμογόνου TMB σε ένα από τα φιαλίδια του ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος (H₂O₂ σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών/κιτρικών). Συνιστάται αυτοσχέδια προετοιμασία.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- § Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- § Οι μη χρησιμοποιημένες ταινίες πρέπει να φυλάσσονται στους 2-8° C, σε σφραγισμένη σακούλα που περιέχει αποξηραντικό παράγοντα, μέχρι την ημερομηνία λήξης.
- § Μετά την ανασύσταση, οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου παραμένουν σταθερά επί 4 ημέρες στους 2-8°C. Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, πρέπει να σχηματίζονται κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης και να διατηρούνται στους -20° C για 2 μήνες το μέγιστο. Αποφύγετε τους επανειλημμένους κύκλους απόψυξης-κατάψυξης.
- § Το συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης είναι σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την ημερομηνία λήξης.

- § Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- § Μετά την πρώτη χρήση του, το σύζευγμα παραμένει σταθερό έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8°C.
- § Το φρέσκο παρασκευασμένο αποκαλυπτικό διάλυμα είναι σταθερό, πριν τη χρήση, για 15 λεπτά το μέγιστο σε θερμοκρασία δωματίου και πρέπει να απορρίπτεται στη συνέχεια.
- § Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του kit ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- § Ο ορός θα πρέπει να αφαιρεθεί όσο το δυνατόν νωρίτερα από το πύγμα των ερυθροκυττάρων μετά την πήξη και τη φυγοκέντριση και να διατηρηθεί στους 4°C. Αν τα δείγματα δεν χρησιμοποιηθούν αμέσως, θα πρέπει να διατηρηθούν στους -20°C επί 2 μήνες το μέγιστο και στους -70°C για μεγαλύτερης διάρκειας φύλαξη (έως ένα έτος).
- § Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- § Φέρετε όλα τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Συνιστάται η ανάμιξη των δειγμάτων σε συσκευή στροβίλισμού πριν από τη χρήση.
- § Οι συνθήκες δειγματοληψίας μπορούν να επηρεάσουν τις τιμές. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να λαμβάνονται αυστηρά μέτρα προφύλαξης κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας για την αποφυγή προσμίξεων στα δείγματα λήψης, τα οποία θα διέγειραν την παραγωγή TNF-α από αιμοκύτταρα και θα αύξαναν εσφαλμένα τις τιμές του TNF-α στον ορό.
- § Τα σωληνάρια συλλογής θα πρέπει να είναι ελεύθερα πυρογενών.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό

Μη χρησιμοποιείτε το kit ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες kit. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Εκτελέστε εις διπλούν ανάληψη των βαθμονομητών, των ορών ελέγχου και των δειγμάτων. Συνιστάται κάθετη ευθυγράμμιση. Χρησιμοποιήστε ένα καθαρό, πλαστικό δοχείο για να ετοιμάσετε το διάλυμα πλύσης. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Για τη διανομή του αποκαλυπτικού διαλύματος και του ανασχετικού διαλύματος αποφύγετε πιπέτες με μεταλλικά μέρη. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Για να αποφύγετε τη μετατόπιση, ο χρόνος μεταξύ της διανομής με πιπέτα του πρώτου βαθμονομητή και του τελευταίου δείγματος πρέπει να περιορίζεται στο χρονικό διάστημα που αναφέρεται στην ενότητα XIII, παράγραφος E (Μεσοδιάστημα). Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις. Το αποκαλυπτικό διάλυμα θα πρέπει να είναι άχρωμο. Εάν εντός λίγων λεπτών από την παρασκευή σχηματιστεί μπλε χρώμα, το αντιδραστήριο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί και πρέπει να το απορρίψετε. Διανείμετε το αποκαλυπτικό διάλυμα εντός 15 λεπτών μετά την πλύση της πλάκας μικροτιτλοδότησης. Κατά τη διάρκεια της επώασης με το αποκαλυπτικό διάλυμα, αποφύγετε την άμεση έκθεση της πλάκας μικροτιτλοδότησης στην ηλιακή ακτινοβολία.

B. Διαδικασία

1. Επιλέξτε τον απαιτούμενο αριθμό ταινιών για την ανάλυση. Οι μη χρησιμοποιημένες ταινίες πρέπει να ξανασφραγιστούν μέσα στη σακούλα με τον αποξηραντικό παράγοντα και να φυλαχτούν σε θερμοκρασία 2-8°C.
2. Ασφαλίστε τις ταινίες μέσα στο πλαίσιο στήριξης.
3. Διανείμετε με πιπέτα 50 µl ρυθμιστικού διαλύματος επώασης σε όλες τις υποδοχές.
4. Διανείμετε με πιπέτα 200 µl από κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα στις κατάλληλες υποδοχές.
5. Επώαστε επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε οριζόντιο αναδευτήρα στις 700 rpm $\pm$ 100 rpm.
6. Αναρροφήστε το υγρό από κάθε υποδοχή.
7. Πλύνετε την πλάκα 3 φορές:
 - § διανέμοντας 0,4 ml διαλύματος πλύσης σε κάθε υποδοχή.
 - § αναρροφώντας το περιεχόμενο κάθε υποδοχής
8. Διανείμετε με πιπέτα 100 µl μηδενικού βαθμονομητή σε όλες τις υποδοχές
9. Διανείμετε με πιπέτα 50 µl συζεύγματος αντι-TNF-α μέσα σε όλες τις υποδοχές.
10. Επώαστε επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε οριζόντιο αναδευτήρα στις 700 rpm $\pm$ 100 rpm.
11. Αναρροφήστε το υγρό από κάθε υποδοχή.

12. Πλύνετε την πλάκα 3 φορές:
 - § διανέμοντας 0,4 ml διαλύματος πλύσης σε κάθε υποδοχή.
 - § αναρροφώντας το περιεχόμενο κάθε υποδοχής
13. Διανείμετε με πιπέτα 200 µl φρέσκου παρασκευασμένου αποκαλυπτικού διαλύματος μέσα σε κάθε υποδοχή 15 λεπτά μετά το βήμα της πλύσης.
14. Επώαστε την πλάκα μικροτιτλοδότησης επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε οριζόντιο αναδευτήρα στις 700 rpm $\pm$ 100 rpm, αποφύγετε την άμεση έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία.
15. Διανείμετε με πιπέτα 50 µl ανασχετικού διαλύματος σε κάθε υποδοχή.
16. Κάντε ανάγνωση των απορροφήσεων στα 450 nm και 490 nm (φίλτρο αναφοράς 630 nm ή 650 nm) εντός 3 ωρών και υπολογίστε τα αποτελέσματα όπως περιγράφεται στην ενότητα XI.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

A. Πολυχρωματική ανάγνωση:

1. Στην περίπτωση αυτή, την επεξεργασία των δεδομένων θα κάνει το λογισμικό του ELISA-AID™.
2. Η ανάγνωση της πλάκας γίνεται πρώτα στα 450 nm έναντι ενός φίλτρου αναφοράς που ρυθμίζεται στα 650 nm (ή τα 630 nm).
3. Εκτελείται δεύτερη ανάγνωση στα 490 nm έναντι του ίδιου φίλτρου αναφοράς.
4. Το λογισμικό του ELISA-AID™ θα ενεργοποιήσει αυτόματα τη συσκευή ανάγνωσης και θα ενσωματώσει και τις δύο μετρήσεις σε ένα πολυχρωματικό μοντέλο. Αυτή η τεχνική μπορεί να δημιουργήσει οπτικές πυκνότητες (OD) έως και 10.
5. βασική αρχή της επεξεργασίας των πολυχρωματικών δεδομένων έχει ως εξής:
 - § $X_i = OD$ στα 450 nm
 - § $Y_i = OD$ στα 490 nm
 - § Χρησιμοποιώντας τυπική μη σταθμισμένη γραμμική παλινδρόμηση, υπολογίζονται οι παράμετροι A & B: $Y = A \cdot X + B$
 - § Αν $X_i < 3$ μονάδες OD, τότε υπολογισθέν $X = X_i$
 - § Αν $X_i > 3$ μονάδες OD, τότε υπολογισθέν $X = (Y_i - B)/A$
 - § Χρησιμοποιείται προσαρμογή λογιστικής καμπύλης 4 παραμέτρων για τη δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης.
 - § Η συγκέντρωση TNF-α στα δείγματα καθορίζεται μέσω αναγωγής στην καμπύλη βαθμονόμησης.

B. Διχρωματική ανάγνωση

1. Κάντε ανάγνωση της πλάκας στα 450 nm έναντι ενός φίλτρου αναφοράς που ρυθμίζεται στα 650 nm (ή τα 630 nm).
2. Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
3. Σε ημιλογαριθμικό ή γραμμικό χαρτί γραφημάτων, παραστήστε γραφικά τις τιμές OD (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης του TNF-α (τετμημένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, συνδέοντας με ευθείες γραμμές τα αποτυπωμένα σημεία.
4. Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε ορό ελέγχου και δείγμα με αναγωγή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
5. Αναγωγή δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

TNF-α-EASIA		Μονάδες OD Πολυχρωματικό μοντέλο
Βαθμονομητής	0 pg/ml	0,045
	6,8 pg/ml	0,120
	18 pg/ml	0,259
	52 pg/ml	0,619
	176 pg/ml	1,435
	518 pg/ml	3,237

XIII. ΑΠΟΛΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

Μετρήθηκαν είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεις OD σε μηδενική δέσμευση, ήταν 0,7 pg/ml.

B. Ειδικότητα

Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διασταυρούμενη αντίδραση παρουσία 50 ng of IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TNF-β, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, TGF-β, GM-CSF, OSM, MIP-1α, MIP-1β, LIF, MCP-1, G-CSF and RANTES. Ο παρών προσδιορισμός TNF-α είναι ειδικός για τον ανθρώπινο, φυσικό και ανασυνδυασμένο TNF-α.

Γ. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Ορός	N	<X> ± T.A. (pg/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (pg/ml)	Σ.Δ. (%)
A	20	91 ± 6	6,6	A	24	122 ± 5	4,5
B	20	526 ± 33	6,3	B	24	431 ± 14	3,3

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

Δ. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ			
Δείγμα	Προσθεθείς TNF-α (pg/ml)	Ανακτηθείς TNF-α (pg/ml)	Ανάκτηση (%)
Ορός 1	0	6,2	-
	38,4	43,3	97
	83,9	90,0	100
	188,3	192,5	99
	408,2	376,2	91
Ορός 2	0	3,8	-
	38,4	45,5	108
	83,9	91,2	104
	188,3	162,2	84
	408,2	379,2	92

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ			
Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (pg/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (pg/ml)
Ορός 1	1	-	436,5
	2	218,3	212,4
	4	109,1	104,8
	8	54,6	59,5
	16	27,3	31,7
Ορός 2	1	-	420,2
	2	210,1	211,2
	4	105,0	98
	8	52,5	58,3
	16	26,3	30,7

Τα δείγματα αραιώθηκαν με μηδενικό βαθμονομητή.

- Ε. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος
- Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν αξιόπιστα ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 30 λεπτά μετά την προσθήκη των βαθμονομητών στα επιστρωμένα σωληνάρια.

	T0	30 λεπτά	45 λεπτά
SC1	202	183	222
SC2	506	520	565

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- § Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- § Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης. Οροί ελέγχου που περιέχουν αζίδιο θα επιδράσουν στην ενζυμική αντίδραση και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν.
- § Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.
- § Συνιστάται οι οροί ελέγχου να υποβάλλονται σε προσδιορισμό τακτικά ως άγνωστα δείγματα για να μετράται η μεταβλητότητα του προσδιορισμού. Η απόδοση του προσδιορισμού πρέπει να παρακολουθείται με διαγράμματα ποιοτικού ελέγχου των ορών ελέγχου.
- § Είναι καλό το να ελέγχετε οπτικά την προσαρμογή της καμπύλης που επιλέχθηκε από τον υπολογιστή.

XV. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές αυτές παρέχονται μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.

Τα παρακάτω αποτελέσματα παρέχονται μόνο ως οδηγός: τα αποτελέσματα 30 δειγμάτων ορού από εμφανώς υγιή άτομα με χαμηλά επίπεδα CRP, κυμάνθηκαν μεταξύ 4,6 και 12,4 pg/ml.

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφαλείας

Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο κιτ αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Αποφύγετε κάθε επαφή με το δέρμα με όλα τα αντιδραστήρια. Το ανασχετικό διάλυμα περιέχει H₂SO₄, η χρωμογόνο ουσία περιέχει TMB σε διμεθυλφορμαμίδιο, το ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος περιέχει H₂O₂. Σε περίπτωση επαφής, πλύνετε σχολαστικά με νερό.

Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης.

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- BEUTLER B., CERAMI A. (1987)
Cachectin : more than a tumor necrosis factor.
N. Engl. J. Med., 316 ; 379-385.
- TRACEY K.J., FONG Y., HESSE D.G., MANOGUE K.R., LEE A.T., KUO G.C., LOWRY S.F. and CERAMI A. (1987)
Anti cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. Nature, 330 ; 662-664.
- PIGUET P.F., GRAU G.E., ALLET B. and VASSALLI P. (1987)
Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-versus-host disease.
J. Exp. Med., 166 ; 1280-1289.
- AUKRUST P., LIABAKK N-B., MÜLLER F., LIEN E., ESPEVIK T. and FROLAND S.S. (1994)
Serum Levels of Tumor Necrosis Factor-α (TNFα) and Soluble TNF Receptors in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection - Correlations to Clinical Immunologic, and Virologic Parameters.
J. Inf. Dis., 169:420-424.
- WAAGE A., HALSTENSEN A. and ESPEVIK T. (1987)
Association between tumor necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. Lancet, 1 ; 355-357.
- LEROUX-ROELS G., OFFNER F., PHILIPPE J. and VERMEULEN A. (1988)
Influence of Blood-Collecting Systems on Concentrations of Tumor Necrosis Factor in Serum and Plasma. Clin. Chem., 34 ; 2373-2374.

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ (μl)	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ (μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης	50	50
Βαθμονομητές (0-5)	200	-
Δείγματα, οροί ελέγχου	-	200
Επώαστε επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση στις 700 rpm). Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε υποδοχής. Πλύνετε 3 φορές με 400 μl διαλύματος πλύσης και αναρροφήστε.		
Μηδενικός βαθμονομητής	100	100
Σύζευγμα αντι-TNF-α-HRP	50	50
Επώαστε επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση στις 700 rpm). Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε υποδοχής. Πλύνετε 3 φορές με 400 μl διαλύματος πλύσης και αναρροφήστε.		
Αποκαλυπτικό διάλυμα	200	200
Επώαστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση στις 700 rpm).		
Ανασχετικό διάλυμα	50	50
Διαβάστε σε συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης και καταγράψτε την απορρόφηση κάθε υποδοχής στα 450 nm (και 490 nm) έναντι 630 (ή 650 nm)		

Αρ. καταλόγου DIAsource: KAP1751	Αριθμός P.I.: 1700571/el	Αρ. αναθεώρησης: 090508/1
-------------------------------------	-----------------------------	------------------------------

	<u>Used symbols</u>	<u>Symboles utilisés</u>
	Consult instructions for use	Consulter les instructions d'utilisation
	Storage temperature	Température de conservation
	Use by	Utiliser jusque
	Batch code	Numéro de lot
	Catalogue number	Référence de catalogue
	Control	Contrôle
	In vitro diagnostic medical device	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Manufacturer	Fabricant
	Contains sufficient for <n> tests	Contenu suffisant pour <n> tests
	Wash solution concentrated	Solution de lavage concentrée
	Zero calibrator	Calibrateur zéro
	Calibrator #	Calibrateur #
	Control #	Contrôle #
	Tracer	Traceur
	Tracer	Traceur
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tubes	Tubes
	Incubation buffer	Tampon d'incubation
	Acetonitrile	Acétonitrile
	Serum	Sérum
	Specimen diluent	Diluant du spécimen
	Dilution buffer	Tampon de dilution
	Antiserum	Antisérum
	Immunoabsorbent	Immunoabsorbant
	Calibrator diluent	Diluant de calibrateur
	Reconstitution solution	Solution de reconstitution
	Polyethylene glycol	Glycol Polyéthylène
	Extraction solution	Solution d'extraction
	Elution solution	Solution d'élution
	Bond Elut Silica cartridges	Cartouches Bond Elut Silica
	Pre-treatment solution	Solution de pré-traitement
	Neutralization solution	Solution de neutralisation
	Tracer buffer	Tampon traceur
	Microtiterplate	Microplaque de titration
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	Conjugate buffer	Tampon conjugué
	Chromogenic TMB concentrate	Chromogène TMB concentré
	Chromogenic TMB solution	Solution chromogène TMB
	Substrate buffer	Tampon substrat
	Stop solution	Solution d'arrêt
	Incubation serum	Sérum d'incubation
	Buffer	Tampon
	AP Conjugate	AP Conjugué
	Substrate PNPP	Tampon PNPP
	Biotin conjugate concentrate	Biotine conjugué concentré
	Avidine HRP concentrate	Avidine HRP concentré
	Assay buffer	Tampon de test
	Biotin conjugate	Biotine conjugué
	Specific Antibody	Anticorps spécifique
	Streptavidin HRP concentrate	Concentré streptavidine HRP
	Non-specific binding	Liant non spécifique
	2nd Antibody	Second anticorps
	Acidification Buffer	Tampon d'acidification

	<u>Gebruikte symbolen</u>	<u>Gebrauchte Symbolen</u>
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing	Gebrauchsanweisung beachten
	Bewaartemperatuur	Lagern bei
	Houdbaar tot	Verwendbar bis
	Lotnummer	Chargenbezeichnung
	Catalogusnummer	Bestellnummer
	Controle	Kontrolle
	Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek	In Vitro Diagnostikum
	Fabrikant	Hersteller
	Inhoud voldoende voor <n> testen	Ausreichend für <n> Ansätze
	Wasoplossing, geconcentreerd	Waschlösung-Konzentrat
	Nulkalibrator	Null kalibrator
	Kalibrator #	Kalibrator #
	Controle #	Kontrolle #
	Tracer	Tracer
	Tracer	Tracer
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Buisjes	Röhrchen
	Incubatiebuffer	Inkubationspuffer
	Acetonitrile	Azetonitril
	Serum	Humanserum
	Specimen diluent	Probenverdünner
	Verdunningsbuffer	Verdünnungspuffer
	Antiserum	Antiserum
	Immunoabsorbent	Immunadsorbens
	Kalibratorverdunner	Kalibratorverdünnung
	Reconstitutieoplossing	Rekonstitutionslösung
	Polyethyleen glycol	Polyethylenglykol
	Extractieoplossing	Extraktionslösung
	Elutieoplossing	Eluierungslösung
	Bond Elut Silica kolom	Bond Elut Silikakartuschen
	Pre-behandelingsoplossing	Vorbehandlungslösung
	Neutralisatieoplossing	Neutralisierungslösung
	Tracerbuffer	Tracer-Puffer
	Microtiterplaat	Mikrotiterplatte
	HRP Conjuaat	HRP Konjugat
	HRP Conjuaat	HRP Konjugat
	HRP Conjuaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	HRP Conjuaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	Conjuaat buffer	Konjugatpuffer
	Chromogene TMB geconcentreerd	Chromogenes TMB Konzentrat
	Chromogene Oplossing TMB	Farblösung TMB
	Substraatbuffer	Substratpuffer
	Stopoplossing	Stopplösung
	Incubatieserum	Inkubationsserum
	Buffer	Puffer
	AP Conjuaat	AP Konjugat
	Substraat PNPP	Substrat PNPP
	Geconcentreerd Biotine conjuaat	Biotin-Konjugat-Konzentrat
	Geconcentreerd Avidine-HRP conjuaat	Avidin-HRP-Konzentrat
	Assay buffer	Assaypuffer
	Biotine conjuaat	Biotin-Konjugat
	Specifiek antilichaam	Spezifischer Antikörper
	Streptavidine-HRP concentraat	HRP Streptavidinkonzentrat
	Aspecifieke binding	Unspezifische Bindung
	2de antilichaam	Sekundärer Antikörper
	Verzuringbuffer	Ansäuerungspuffer

	<u>Simboli utilizzati</u>	<u>Símbolos utilizados</u>
	Consultare le istruzioni per l'uso	Consultar las instrucciones de uso
	Limitazioni di temperatura	Limitación de temperatura
	Utilizzare entro	Fecha de caducidad
	Numero di lotto	Código de lote
	Numero di catalogo	Número de catálogo
	Controllo	Control
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabbricante	Fabricante
	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos
	Tampone di lavaggio concentrato	Solución de lavado concentrada
	Calibratore zero	Calibrador cero
	Standard #	Calibrador #
	Controllo #	Control #
	Marcato	Trazador
	Marcato	Trazador
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Provette	Tubos
	Tampone incubazione	Tampón de incubación
	Acetonitrile	Acetonitrilo
	Siero	Suero
	Diluente campione	Diluyente de Muestra
	Tampone diluizione	Tampón de dilución
	Antisiero	Antisuero
	Immunoassorbente	Inmunoadsorbente
	Diluente calibratore	Diluyente de calibrador
	Soluzione di ricostituzione	Solución de Reconstitución
	Polietilenglicole	Glicol Polietileno
	Soluzione di estrazione	Solución de extracción
	Soluzione di eluizione	Solución de elución
	Cartucce di silice bond elut	Cartuchos Bond Elut Silica
	Soluzione di pretrattamento	Solución de Pre-tratamiento
	Soluzione di neutralizzazione	Solución de Neutralización
	Tracer Buffer	Tampón de trazador
	Piastra di microtitolazione	Placa de microvaloración
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	Buffer coniugato	Tampón de Conjugado
	Cromogena TMB concentrato	Cromógena TMB concentrada
	Soluzione cromogena TMB	Solución Cromógena TMB
	Tampone substrato	Tampón de sustrato
	Soluzione di arresto	Solución de Parada
	Incubazione con siero	Suero de Incubación
	Buffer	Tampón
	AP Coniugato	AP Conjugado
	Substrato PNPP	Sustrato PNPP
	Concentrato coniugato con biotina	Concentrado de conjugado de biotina
	Concentrato avidina HRP	Concentrado avidina-HRP
	Soluzione tampone per test	Tampón de ensayo
	Coniugato con biotina	Conjugado de biotina
	Anticorpo Specifico	Anticuerpo específico
	Streptavidina-HRP concentrata	Estreptavidina-HRP Concentrado
	Legame non-specifico	Unión no específica
	2° Anticorpo	Segundo anticuerpo
	Tampone Acidificante	Tampón de Acidificación

	<u>Símbolos utilizados</u>	<u>Använda symboler</u>
	Consulte instruções de utilização	Läs instruktionerna före användning
	Temperatura de conservação	Förvaringstemperatur
	Utilizar antes de	Används av
	Código de lote	Lotnummer
	Número de catálogo	Katalognummer
	Controlo	Kontroll
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro	In vitro diagnostiskt kit
	Fabricante	Tillverkare
	Conteúdo suficiente para <n> testes	Innehållet räcker till <n> prover
	Solução de lavagem concentrada	Tvättlösning, koncentrerad
	Calibrador zero	Nollkalibrerare
	Calibrador #	Kalibrator #
	Controlo #	Kontroll #
	Marcador	Radioisotop, antigen
	Marcador	Radioisotop, antikropp
	Marcador concentrada	Radioisotop, antigen koncentrerad
	Marcador concentrada	Radioisotop, antikropp koncentrerad
	Tubos	Rör
	Tampão de incubação	Inkuberingsbuffert
	Acetonitrilo	Acetonitril
	Soro	Serum
	Diluidor de espécimes	Spädningsbuffert för prover
	Tampão de diluição	Spädningsbuffert
	Anti-soro	Antiserum
	Imunoadsorvente	Immunoadsorberare
	Diluyente do calibrador	Kalibratordiluent
	Solução de Reconstituição	Rekonstitutionslösning
	Polietileno-glicol	Polyetylglykol
	Solução de Extracção	Extraktionslösning
	Solução de Eluição	Elueringslösning
	Cartuchos de sílica Bond Elut	Silikonpatroner för elueringsbindning
	Solução de pré-tratamento	Förbehandlingslösning
	Solução de neutralização	Neutraliseringslösning
	Tampão Marcador	Tracerbuffert
	Placa de micro titulação	Microtiterplatta
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	Conjuge o tampão	Konjugatbuffert
	Cromogénica TMB concentrada	Kromogeniskt TMB-koncentrat
	Solução Cromogénica TMB	Kromogenisk TMB-lösning
	Tampão de substrato	Substratbuffert
	Solução de Paragem	Stoplösning
	Soro de incubação	Inkubationsserum
	Tampão	Buffert
	AP Conjugação	AP-konjugat
	Substrato PNPP	Substrat-PNPP
	Concentrado conjugado de biotina	Biotinkonjugat koncentrat
	Concentrado HRP de avidina	Avidin HRP-koncentrat
	Tampão de ensaio	Provbuffert
	Conjugado de biotina	Biotinkonjugat
	Anticorpo específico	-
	Estreptavidina HRP concentrado	-
	Ligações não específicas	-
	Anticorpo secundário	-
	Tampão de acidificação	-

	<u>Επεξήγηση συμβόλων</u>	<u>Anvendte symboler</u>
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης	Læs brugsvejledningen
	Θερμοκρασία αποθήκευσης	Opbevaringstemperatur
	Ημερομηνία λήξης	Anvend inden
	Αριθμός παρτίδας	Batchkode
	Αριθμός καταλόγου	Katalognummer
	Πρότυπο ελέγχου	Kontrol
	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnosticering
	Κατασκευαστής	Fabrikant
	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις	Indeholder nok til <n> test
	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης	Koncentreret vaskeopløsning
	Μηδενικός βαθμονομητής	Nul-kalibrator
	Βαθμονομητής #	Kalibrator nr.
	Ορός ελέγχου #	Kontrol nr.
	Ιχνηθέτης	Markør
	Ιχνηθέτης	Markør
	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης	Koncentreret markør
	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης	Koncentreret markør
	Σωληνάρια	Tuber
	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης	Inkubationsbuffer
	Ακετονιτρίλιο	Acetonitril
	Ορός	Serum
	Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων	Prøvediluent
	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης	Fortyndingsbuffer
	Αντιορός	Antiserum
	Ανοσοπροσροφητικό	Immonoadsorbent
	Αραιωτικό βαθμονομητών	Kalibratordiluent
	Διάλυμα ανασύστασης	Rekonstitueringsopløsning
	Πολυαιθυλενογλυκόλη	Polyetylglykol
	Διάλυμα εκχύλισης	Ekstraktionsopløsning
	Διάλυμα έκλουσης	Elueringsopløsning
	Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut	Patroner med bindingselueringssilica
	Διάλυμα προεπεξεργασίας	Forbehandlingsopløsning
	Διάλυμα εξουδετέρωσης	Neutraliseringsopløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Markørbuffer
	Πλάκα μικροτιτλοδότησης	Mikrotiterplade
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος	Konjugatbuffer
	Χρωμογόνος TMB	Kromogen TMB-koncentreret
	Διάλυμα χρωμογόνου TMB	Kromogen TMB-opløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος	Substratbuffer
	Ανασχετικό αντιδραστήριο	Stopopløsning
	Ορός επώασης	Inkubationsserum
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Buffer
	AP Σύζευγμα	AP-konjugat
	PNPP υποστρώματος	Substrat PNPP
	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat koncentrat
	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP	Avidin HRP koncentrat
	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού	Prøvebuffer
	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat
	Ειδικό Αντίσωμα	-
	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεξευγμένη με HRP	-
	μη-ειδική δέσμευση	-
	2ο Αντίσωμα	-
	Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο	-

	<u>Stosowane symbole</u>	<u>Használt szimbólumok</u>
	Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją	Olvassa el a használati útmutatót
	Temperatura przechowywania	Tárolási hőmérséklet
	Zużyć przed	Lejáratí idő
	Kod serii	Gyártási kód
	Numer katalogowy	Katalógus szám
	Kontrola	Kontrol
	Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro	In vitro diagnosztikai eszköz
	Producent	Gyártó
	Zawartość wystarczająca do <n> testów	Tartalma <n> teszt elvégzésére elegendő
	Roztwór płuczący stężony	Mosó folyadék koncentrátum
	Kalibrator zerowy	Zero kalibrátor
	Kalibrator nr	Kalibrátor #
	Kontrola nr	Kontrol #
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Probówki	Csővek
	Wymagana inkubacja buforu	Inkubáló puffer
	Acetonitryl	Acetonitril
	Surowica	Szérum
	Rozcieńczalnik próbki	Mintahígító
	Bufor do rozcieńczania	Hígító puffer
	Antysurowica	Antiszérum
	Immunoabsorbent	Immunadszorbens
	Rozcieńczalnik kalibratora	Kalibrátor hígító
	Roztwór do rozcieńczania	Mintaelőkészítő oldat
	Glikol poli(oksy)etylenowy	Polietilén glikol
	Roztwór ekstrakcyjny	Extrakciós oldat
	Roztwór elucyjny	Eluáló oldat
	Kolumny krzemionkowe Bond Elut	Bond Elut Silica szilikagél patronok
	Roztwór do przygotowania wstępnego	Előkezelő oldat
	Roztwór neutralizujący	Semlegesítő oldat
	Bufor znacznika	Nyomjelző izotóp hígító puffer
	mikro płytki	Mikrotiter lemez
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Bufor do koniugacji	Konjugátum puffer
	Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzodyny)	Kromogén TMB koncentrátum
	Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzodyny)	Kromogén TMB oldat
	Bufor substratu	Szubsztrát puffer
	Roztwór zatrzymujący reakcję	Stop oldat
	Wymagana inkubacja surowicy	Inkubációs szérum
	Bufor	Puffer
	Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)	AP konjugátum
	p-nitrofenylofosforan substratowy	Szubsztrát PNPP
	Koncentrat koniugatu biotyny	Biotin konjugátum koncentrátum
	Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną	Avidin HRP koncentrátum
	Bufor do oznaczania	Vizsgálati puffer
	Koniugatu biotyny	Biotin konjugátum
	Przeciwciało swoiste	Specifikus ellenanyag
	Koncentrat streptawidyny HRP	Sztreptawidin HRP koncentrátum
	Wiązanie nieswoiste	Nem-specifikus kötődés
	Drugie przeciwciało	Másodlagos ellenanyag
	Bufor zakwaszający	Savas puffer

	<u>Използвани символи</u>
	Вижте инструкцията за работа
	Температура на съхранение
	Използвайте с
LOT	Партиден код
REF	Каталожен номер
CONTROL	Контрол
IVD	Ин витро диагностично медицинско изделие
	Производител
	Съдържание достатъчно за <n> теста
WASH SOLN CONC	Концентриран измиващ разтвор
CAL 0	Нулев калибратор
CAL N	Калибратор #
CONTROL N	Контрол #
Ag 125I	Трейсър
Ab 125I	Трейсър
Ag 125I CONC	Концентриран маркер
Ab 125I CONC	Концентриран маркер
	Епруветки
INC BUF	Инкубационен буфер
ACETONITRILE	Ацетонитрил
SERUM	Серум
DIL SPE	Разредител за пробите
DIL BUF	Буфер за разреждане
ANTISERUM	Антисерум
IMMUNOABSORBENT	Имуноабсорбент
DIL CAL	Разредител за калибратора
REC SOLN	Пресъздаващ разтвор
PEG	Полиетилен гликол
EXTR SOLN	Екстрактов разтвор
ELU SOLN	Разтвор за елюиране
GEL	Силикагелни пълнители
PRE SOLN	Пред-лечебен разтвор
NEUTR SOLN	Неутрализиращ разтвор
TRACEUR BUF	Маркерен буфер
	Микротитърна пластина
Ab HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза
Ag HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза
Ab HRP CONC	HRP конюгиран концентрат
Ag HRP CONC	HRP конюгиран концентрат
CONJ BUF	Буфер за конюгата
CHROM TMB CONC	Хромогенен ТМВ концентрат
CHROM TMB	Хромогенен ТМВ разтвор
SUB BUF	Субстратен буфер
STOP SOLN	Стоп разтвор
INC SER	Инкубационен серум
BUF	Буфер
Ab AP	AP конюгат / конюгат на алкална фосфатаза
SUB PNPP	Субстрат PNPP / пара нитрофенил фосфат
BIOT CONJ CONC	Биотин конюгиран концентрат
AVID HRP CONC	Авидин HRP концентрат
ASS BUF	Буфер за пробите
Ab BIOT	Биотин конюгат
Ab	специфично антитяло
SAV HRP CONC	стрептавидин HRP концентрат
NSB	не специфично свързване
2nd Ab	второ антитяло
ACID BUF	киселинизиращ буфер