



sTNF-RII-EASIA

KAP1771



Read entire protocol before use.

sTNF-RII-EASIA

I. INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the in vitro quantitative measurement of human soluble Tumor Necrosis Factor Receptor N°. 2 (sTNF-RII) in serum.

II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name :** DIAsource sTNF-RII-EASIA Kit
- B. Catalogue number :** KAP1771 : 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

sTNF-RII, also named TBPII or p75, is one of the two receptors of tumor necrosis factors that are present at the surface of many cells. Different processes modulate their presence. IL-2 and the activation of T-lymphocytes increase the presence of both TNF-RI and RII. An increase is also noticed during the maturation of the macrophages or in presence of protein kinases activators. On the opposite, TNF-Rs decrease in the presence of H₂O₂, epinephrine, Insulin and somatostatin. The two receptors of TNF are able to bind TNF- α and TNF- β . TNF-RII is the form present on monocytes. The gene present in the chromosome 1 codes for a protein of 461 aa. The MW is about 75 kDa ; that suggests an important glycosylation. According to Tartagliata et al, the TNF-RII could be at the origin of the thymocytes and lymphocytes T cytotoxic proliferation. The proliferation of circulating human mononuclear cells under the influence of PHA involves the participation of the two receptors. Soluble forms of the receptors are shedded from the cell membrane and are present in urine, plasma or culture supernatants.

B. Clinical application

The presence of the soluble receptors for TNF has been proved in the serum of cancer patients, chronic renal deficiency and in the broncho-alveolar lavage of patients suffering from ARDS. The soluble receptors for TNF are also putative markers of disease progression in HIV infection and, compared to controls, sTNF-RII is already higher in asymptomatic carriers. sTNF-R correlates also with parasitemia and disease severity in human malaria. These forms bind perfectly the TNF and, in high concentration, inhibit the biological activity of TNF. In some conditions, these soluble forms are able to protect TNF and increase its half live.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DAsource sTNF-RII-EASIA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on microtiterplate. The assay uses monoclonal antibodies (MAbs) directed against distinct epitopes of sTNF-RII. 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 sTNF-RII – 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 sTNF-RII concentration.

A calibration curve is plotted and sTNF-RII 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 sTNF-RII (monoclonal antibodies)	96 wells	blue	Ready for use			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>HRP</td></tr></table> Conjugate: HRP labelled anti-sTNF-RII (monoclonal antibodies) in TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin and thymol	Ab	HRP	1 vial 21 ml	red	Ready for use	
Ab	HRP					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Zero Calibrator: bovine serum with benzamidin and thymol	CAL	0	1 vial 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 bovine serum with benzamidin and thymol	CAL	N	5 vials lyophil.	yellow	Add 0.5 ml distilled water	
CAL	N					
<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 with benzamidin and thymol	CONTROL	N	2 vials lyophil.	silver	Add 0.5 ml distilled water	
CONTROL	N					
<table border="1"><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table> Chromogenic TMB Solution	CHROM	TMB	1 vial 25 ml	white	Ready for use	
CHROM	TMB					
<table border="1"><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> Stop Solution: HCl 2N	STOP	SOLN	1 vial 25 ml	white	Ready for use	
STOP	SOLN					

Note: 1. Use zero calibrator for sample dilutions.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

- High quality distilled water
- Pipettes for delivery of: 50 µl, 200 µl, 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 ± 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

- Calibrators:** Reconstitute the zero calibrator to the volume specified on the vial label with distilled water and the other calibrators with 0.5 ml distilled water.
- Controls:** Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- 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.

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.
- 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 sTNF-RII production by blood cells and thus falsely increase plasma sTNF-RII values.
- Collection tubes must be pyrogen-free.

X. PROCEDURE

- 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 Chromogenic 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.
Dispense the Chromogenic Solution within 15 minutes following the washing of the microtiterplate.
During incubation with Chromogenic Solution, avoid direct sunlight on the microtiterplate.
- 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 µl of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.

- Pipette 200 µl of anti-sTNF-RII-HRP conjugate into all the wells.
- Incubate for 1 hour at room temperature on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 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 50 µl of the Chromogenic Solution into each well within 15 minutes following the washing step.
- Incubate the microtiterplate for 15 minutes at room temperature on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm, avoid direct sunlight.
- Pipette 200 µl 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 sTNF-RII 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 sTNF-RII (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.

sTNF-RII-EASIA		OD units
		Polychromatic model
Calibrator	0 ng/ml	0.028
	1.9 ng/ml	0.141
	3.9 ng/ml	0.287
	17 ng/ml	0.926
	48 ng/ml	1.840
	142 ng/ml	3.407

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 0.04 ng/ml.

B. Specificity

Cross-reactivity and interference were analysed by the addition of different analytes to sTNF-RII samples and measuring the apparent sTNF-RII concentration.

Analyte	sTNF-RII 2.86 ng/ml (Ratio [*])	sTNF-RII 8.85 ng/ml (Ratio [*])	sTNF-RII 28.76 ng/ml (Ratio [*])
+ sTNF-RI (p55) (1500 ng/ml)	3.0 ng/ml (104.9 %)	9.08 ng/ml (102.6 %)	29.48 ng/ml (102.5 %)
Analyte	sTNF-RII 0.80 ng/ml (Ratio [*])	sTNF-RII 4.36 ng/ml (Ratio [*])	sTNF-RII 27.66 ng/ml (Ratio [*])
+ TNF-α (500 ng/ml)	0.75 ng/ml (93.8 %)	3.83 ng/ml (87.8 %)	23.63 ng/ml (85.4 %)

Ratio^{*} : $\frac{\text{sTNF-RII measured in the presence of analyte} \times 100}{\text{sTNF-RII added in the absence of analyte}}$

This demonstrates that the sTNF-RII EASIA does not cross react with sTNF-RI and that TNF-α does not interfere with the assay.

C. Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	3.03 ± 0.06	2.1	A	20	5.2 ± 0.7	13.5
B	9	18.5 ± 0.7	3.7	B	20	16.2 ± 0.8	4.9

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST

Sample	Added sTNF-RII (ng/ml)	Recovered sTNF-RII (ng/ml)	Recovery (%)
Serum	0	4.2	-
	3.9	8.4	107.7
	15.4	20.7	106.5
	34.9	39.1	99.7

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (ng/ml)	Measured Concent. (ng/ml)
Serum	1/1	-	39.1
	1/2	19.5	19.3
	1/4	9.8	9.6
	1/8	4.9	5.1
	1/16	2.4	2.6

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.

TIME DELAY			
	T0	15 min	30 min
S1	4.7	5.3	5.1
S2	3.6	3.9	3.9
S3	4.3	4.3	3.9
S4	4.6	4.9	5.4

F. Hook effect

A sample spiked with sTNF-RII up to 3000 ng/ml gives higher OD's than the last calibrator point.

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 36 serum samples from apparently healthy persons with low CRP levels, ranged between 0 and 60.2 ng/ml. 35 of the 36 samples obtained values below 20 ng/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 HCl. 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

1. DIETRICH M. and PORZSOLT F. (1992)
Soluble tumor necrosis factor receptors correlate with parasitemia and disease severity in human malaria.
J. Infec. Dis., 166 : 930-934.

2. GODFRIED M.H., VAN DER POLL T., JANSEN J., ROMIJN J.A., EEFTINCK-SCHATTENKERK J.K.M., ENDERT E., VAN DEVENTER S.J.H. and SAUERWEIN H.P. (1993)
Soluble receptors for tumor necrosis factor : a putative marker of disease progression in HIV infection.
AIDS, 7 : 33-36.
3. RIMANIOL A.C., BOUSSIN F., HERBELIN A., DE GROOTE D., DORMONT D., BACH J.F., DESCAMPS-LATSCHA B. and ZAVALA F. (1994)
Induction of tumor necrosis factor soluble receptor (TNF-sR75) release by HIV adsorption on cultured human monocytes.
Eur. J. Immunol., 24 : 2055-2060.
4. HERBELIN A., CHATENAUD L., ROUX-LOMBARD P., DE GROOTE D., LEGENDRE C., DAYER J.M., DESCAMPS-LATSCHA B., KREIS H. and BACH J.F. (1995)
In vivo soluble tumor necrosis factor receptor release in OKT3-treated patients.
Transplantation, 59 : 1470-1475.
5. DESCAMPS-LATSCHA B., HERBELIN A., NGUYEN A.T., ROUX-LOMBARD P., ZINGRAFF J., MOYNOT A., VERGER C., DAHMANE D., DE GROOTE D., JUNGERS P. and DAYER J.M. (1995)
Balance between IL-1 β , TNF- α and their specific inhibitors in Chronic Renal Failure and maintenance dialysis : relationship with activation markers of T-cells, B-cells and monocytes.
The J. of Immunol., 154 : 882-892.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	CALIBRATORS (μ l)	SAMPLE(S) CONTROLS (μ l)
Calibrators (0-5) Samples, Controls Anti-sTNF-RII -HRP conjugate	50 - 200	- 50 200
Incubate for 1 hour 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.		
Chromogenic Solution	50	50
Incubate for 15 min at room temperature with continuous shaking at 700 rpm.		
Stop Solution	200	200
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 : KAP1771	P.I. Number : 1700601/en	Revision nr : 090506/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

sTNF-RII-EASIA

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage immuno-enzymatique pour la mesure quantitative *in vitro* du Récepteur soluble N°. 2 du Facteur de Nécrose Tumorale humain (sTNF-RII) dans le sérum.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource sTNF-RII-EASIA kit
- B. **Numéro de catalogue :** KAP1771 : 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 sTNF-RII, également appelé TPBII ou p75, est l'un des deux récepteurs des facteurs de nécrose tumorale se trouvant à la surface de nombreuses cellules. Différents processus modulent leur présence. L'IL-2 et l'activation des lymphocytes T augmentent la présence des deux récepteurs TNF-RI et RII. On note également une augmentation pendant la maturation des macrophages ou en présence d'activateurs des protéine kinases. A l'opposé, le TNF-Rs diminue en présence d'H₂O₂, d'adrénaline, d'insuline et de somatostatine. Les deux récepteurs du TNF sont capables de lier les TNF- α et TNF- β . Le TNF-RII est la forme présente sur les monocytes. Le gène présent sur le chromosome 1 code pour une protéine de 461 acides aminés. Le MW ou TNF-RII possède un poids moléculaire d'environ 75 kDa ; cela suggère une glycosylation importante. D'après Tartagliata et al, le TNF-RII pourrait être à l'origine de la prolifération des thymocytes et des lymphocytes T cytotoxiques.

La prolifération des cellules mononucléaires circulantes sous l'influence de la PHA implique la participation des deux récepteurs. Les formes solubles des récepteurs sont larguées à partir de la membrane cellulaire et se retrouvent dans l'urine, le plasma ou les surnageants de culture.

B. Application clinique

La présence des récepteurs solubles du TNF a été démontrée dans le sérum de patients cancéreux, de patients atteints de déficience rénale et dans le lavage broncho-alvéolaire de patients souffrant d'SDRA. Les récepteurs solubles du TNF sont également des marqueurs putatifs de la progression de la maladie dans l'infection à HIV et, comparés aux contrôles, le sTNF-RII est déjà plus élevé chez les porteurs asymptomatiques. Le s-TNF-R est également corrélé avec une parasitémie et la gravité de la maladie dans la malaria humaine. Ces formes solubles lient parfaitement le TNF et, à concentration élevée, inhibent l'activité biologique du TNF. Dans certaines conditions, elles sont capables de protéger le TNF et augmentent son temps de demi-vie.

IV. PRINCIPES DU DOSAGE

La DIASource sTNF-RII-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 le sTNF-RII. 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 – sTNF-RII – 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 sTNF-RII. Une courbe de calibration est dessinée et la concentration en sTNF-RII 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 sTNF-RII (anticorps monoclonal)		96 puits	bleu	Prêt à l'emploi
Ab HRP Conjugué: anti-sTNF-RII marqué avec de l'HRP (anticorps monoclonal) dans un tampon TRIS-maléate avec de l'albumine bovine et du thymol		1 flacon 21 ml	Rouge	Prêt à l'emploi
CAL 0 Calibrateur zéro : sérum bovin avec de la benzamidine et du thymol		1 flacon lyophilisé	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 bovin avec de la benzamidine et du thymol		5 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée
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 de la benzamidine et du thymol		2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée
CHROM TMB CONC Solution Chromogénique (Tétraméthylbenzidine)		1 flacon 25 ml	Blanc	Prêt à l'emploi
STOP SOLN Solution d'arrêt: HCl 2N		1 flacon 25 ml	Blanc	Prêt à l'emploi

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

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 µl, 200 µl, 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 ± 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)
- Équipement 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 0,5 ml d’eau distillée.
- B. Contrôles :** Reconstituer les contrôles avec 0,5ml d’eau distillée.
- C. 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.

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.
- § 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 de sTNF-RII par les cellules sanguines et ne fassent faussement augmenter les taux sériques de sTNF-RII.
- § 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 Chromogénique 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 Chromogénique 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 Chromogénique.

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 de chaque Calibrateur, Contrôle et Echantillon dans les puits appropriés.
- Pipeter 200 µl du conjugué anti-sTNF-RII-HRP dans tous les puits.
- Incuber pendant 1 heure 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 50 µl de la Solution Chromogénique dans chaque puits dans les 15 minutes après la phase de lavage.
- Incuber la microplaque pendant 15 minutes à température ambiante dans un agitateur horizontal mis à 700 rpm ± 100 rpm, éviter exposition à la lumière du soleil.
- Pipeter 200 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*X + B
§ Si Xi < 3 unités DO, X calculé = Xi
§ Si Xi > 3 unités DO, X calculé = (Yi-B)/A
§ Un lissage de courbes « 4 paramètres » est utilisé pour la courbe de calibration.
§ La concentration en sTNF-RII 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 sTNF-RII (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.

sTNF-RII-EASIA		Unités DO modèle polychromatique
Calibrateur	0 ng/ml	0,031
	1,07 ng/ml	0,208
	2,8 ng/ml	0,553
	9,5 ng/ml	1,530
	27 ng/ml	2,859
	46 ng/ml	3,968

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 0,04 ng/ml.

B. Spécificité

Une réactivité croisée et des interférences ont été analysées en ajoutant différents analytes à différents échantillons de sTNF-RII et en mesurant la concentration apparente en sTNF-RII.

Analyte	sTNF-RII 2,86 ng/ml (Rapport*)	sTNF-RII 8,85 ng/ml (Rapport*)	sTNF-RII 28,76 ng/ml (Rapport*)
+ sTNF-RI (p55) (1500 ng/ml)	3,0 ng/ml (104,9 %)	9,08 ng/ml (102,6 %)	29,48 ng/ml (102,5 %)
Analyte	sTNF-RII 0,80 ng/ml (Rapport*)	sTNF-RII 4,36 ng/ml (Rapport*)	sTNF-RII 227,66 ng/ml (Rapport*)
+ TNF-α (500 ng/ml)	0,75 ng/ml (93,8 %)	3,83 ng/ml (87,8 %)	23,63 ng/ml (85,4 %)

Rapport* : $\frac{\text{sTNF-RII mesuré en présence de l'analyte} \times 100}{\text{sTNF-RII ajouté en l'absence d'analyte}}$
Ceci démontre que le sTNF-RII EASIA n'a pas de réaction croisée avec le sTNF-RI et que le TNF-α n'interfère pas avec l'essai.

C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	3,03 ± 0,06	2,1	A	20	5,2 ± 0,7	13,5
B	9	18,5 ± 0,7	3,7	B	20	16,2 ± 0,8	4,9

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE RECUPERATION			
Echantillon	sTNF-RII ajoutée (ng/ml)	sTNF-RII récupérée (ng/ml)	Récupération (%)
Sérum	0	4,2	-
	3,9	8,4	107,7
	15,4	20,7	106,5
	34,9	39,1	99,7

TEST DE DILUTION			
Echantillon	Dilution	Concent. théorique (ng/ml)	Concent. Mesurée (ng/ml)
Sérum	1/1	-	39,1
	1/2	19,5	19,3
	1/4	9,8	9,6
	1/8	4,9	5,1
	1/16	2,4	2,6

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	10 min	20 min	30 min
S1	4,7	5,3	5,1	5,0
S2	3,6	3,9	3,9	2,3
S3	4,3	4,3	3,9	39,3
S4	4,6	4,9	5,4	13,0

- F. **Effet crochet**
Un échantillon dopé avec de le sTNF-RII jusqu'à 3000 ng/ml donne des DO supérieurs au dernier point de calibration.

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'azoture 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 36 échantillons de sérum de personnes apparemment saines avec de faibles niveaux de CRP se situaient entre 0 et 60,2 ng/ml. 35 échantillons sur les 36 ont montré des valeurs inférieures à 20 ng/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'HCl. 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**

1. DIETRICH M. and PORZSOLT F. (1992)
Soluble tumor necrosis factor receptors correlate with parasitemia and disease severity in human malaria.
J. Infec. Dis., 166 : 930-934.

2. GODFRIED M.H., VAN DER POLL T., JANSEN J., ROMIJN J.A., EEFTINCK-SCHATTENKERK J.K.M., ENDERT E., VAN DEVENTER S.J.H. and SAUERWEIN H.P. (1993)
Soluble receptors for tumor necrosis factor : a putative marker of disease progression in HIV infection.
AIDS, 7 : 33-36.
3. RIMANIOLO A.C., BOUSSIN F., HERBELIN A., DE GROOTE D., DORMONT D., BACH J.F., DESCAMPS-LATSCHA B. and ZAVALA F. (1994)
Induction of tumor necrosis factor soluble receptor (TNF-sR75) release by HIV adsorption on cultured human monocytes.
Eur. J. Immunol., 24 : 2055-2060.
4. HERBELIN A., CHATENAUD L., ROUX-LOMBARD P., DE GROOTE D., LEGENDRE C., DAYER J.M., DESCAMPS-LATSCHA B., KREIS H. and BACH J.F. (1995)
In vivo soluble tumor necrosis factor receptor release in OKT3-treated patients.
Transplantation, 59 : 1470-1475.
5. DESCAMPS-LATSCHA B., HERBELIN A., NGUYEN A.T., ROUX-LOMBARD P., ZINGRAFF J., MOYNOT A., VERGER C., DAHMANE D., DE GROOTE D., JUNGERS P. and DAYER J.M. (1995)
Balance between IL-1 β , TNF- α and their specific inhibitors in Chronic Renal Failure and maintenance dialysis : relationship with activation markers of T-cells, B-cells and monocytes.
The J. of Immunol., 154 : 882-892.

XVIII. **RESUME DU PROTOCOLE**

	CALIBRATEURS (μ l)	ECHANTILLON(S) CONTROLES (μ l)
Calibrateurs (0-5) Echantillons, Contrôles Conjugué Anti-sTNF-RII-HRP	50 - 200	- 50 200
Incuber pendant 1 heure à température ambiante avec agitation continue à 700 rpm. Aspirer le contenu de chaque puits. Laver 3 fois avec 400 μ l de la Solution de Lavage et aspirer.		
Solution Chromogénique	50	50
Incuber pendant 15 min à température ambiante avec agitation continue à 700 rpm.		
Solution d'arrêt	200	200
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 : KAP1771	P.I. Number : 1700601/fr	Revision nr : 090506/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

sTNF-RII-EASIA

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein immunenzymetrisches Assay für die quantitative *in vitro* Bestimmung des humanen löslichen Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptors N°. 2 (sTNF-RII) in Serum.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource sTNF-RII-EASIA Kit
- B. **Katalognummer :** KAP1771 : 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

sTNF-RII, auch TBPII oder p75 genannt, ist einer der beiden Rezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktoren, die sich auf der Oberfläche vieler Zellen befinden. Verschiedene Prozesse modulieren ihr Vorhandensein. IL-2 und die Aktivierung der T-Lymphozyten erhöhen das Vorhandensein von beiden sowohl TNF-RI als auch RII. Ein Anstieg wird ebenfalls festgestellt während der Maturation der Makrophagen oder bei der Präsenz von Proteinkinasenaktivatoren. Auf der andern Seite verringert sich TNF-Rs in Gegenwart von H₂O₂, Adrenalin, Insulin und Somatostatin. Die beiden Rezeptoren von TNF sind in der Lage TNF- α und TNF- β zu binden. TNF-RII ist die auf Monozyten vorkommende Form. Das in Chromosom 1 präsenste Gen kodiert ein Protein von 461 aa.

Das MW von TNF-RII liegt bei 75 kDa ; dies deutet auf eine wichtige Glykosilierung hin. Gemäß Tartagliata et al, kann TNF-RII der Ursprung der Thymozyten und Lymphozyten T zytotoxischen Proliferation sein.

Die Proliferation der zirkulierenden, humanen, mononuklearen Zellen unter dem Einfluss von PHA involviert die Beteiligung der beiden Rezeptoren. Lösliche Formen der Rezeptoren lösen sich von der Zellmembran und sind in Urin, Plasma oder Kulturüberstand vorhanden.

B. Klinische Anwendung

Das Vorhandensein löslicher Rezeptoren für TNF wurde nachgewiesen im Serum von Krebspatienten, bei chronischer Nierenschwäche und in der bronchoalveoläre Flüssigkeit (BAL) von Patienten, die unter ARDS leiden. Die löslichen Rezeptoren sind ebenso mutmaßliche Marker für das Fortschreiten der HIV-Infektion und –im Vergleich mit Kontrollen- liegt sTNF-RII schon höher bei asymptomatisch Infizierten vor. sTNF-R korreliert auch mit Parasitämie und schwereren Erkrankungsformen der humanen Malaria. Diese Formen binden perfekt an TNF und blockieren in hoher Konzentration die biologische Aktivität von TNF. Unter einigen Bedingungen sind diese Formen in der Lage, TNF zu schützen und seine Halbwertszeit zu steigern.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DIASource sTNF-RII-EASIA ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay (EASIA) im Mikrotiterplattenformat. Derr Assay benutzt monoklonale Antikörper (MAbs), die gegen verschiedene Epitope von sTNF-RII 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 - sTNF-RII - 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 sTNF-RII-Konzentration ist. Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die sTNF-RII-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 sTNF-RI-beschichtete Wells (monoklonale Antikörper)		96 Wells	Blau	gebrauchsfertig
Ab HRP Konjugat: MRP beschriftete Anti-sTNF-RII (monoklonale Antikörper) in TRIS-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin und Thymol		1 Gefäß 21 ml	Rot	gebrauchsfertig
CAL 0 Null-Kalibrator : Rinderserum mit Benzamidin und Thymol		1 Gefäß 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 Rinderserum mit Benzamidin und Thymol		5 Gefäße lyophilisiert	Gelb	0,5 ml dest. Wasser zugeben
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 Benzamidin und Thymol		2 Gefäße lyophilisiert	Silber	0,5 ml dest. Wasser zugeben
CHROM TMB Farblösung TMB (Tetramethylbenzidin)		1 Gefäß 25 ml	Weiß	gebrauchsfertig
STOP SOLN Stopplösung: HCl 2N		1 Gefäß 25 ml	Weiß	gebrauchsfertig

Bemerkung: 1. Benutzen Sie den Null-Kalibrator zur Probenverdünnung.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

1. Hochwertiges destilliertes Wasser
2. Pipetten: 50 µl, 200 µl, 1 ml und 10 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegplastikspitzen wird empfohlen)
3. Vortex Mixer
4. Magnetrührer
5. Horizontaler Schüttler für Mikrotiterplatte Kap. 700 rpm ± 100 rpm
6. Waschgerät für Mikrotiterplatten
7. 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)

8. 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 Ettikett des Fläschchens angegebenen Volumen mit dest. Wasser und die anderen Kalibratoren mit 0,5 ml dest. Wasser.
- B. **Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. Wasser.
- C. **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.

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.
- § 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 Blutgerinnsel 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 Probennahme können Werte beeinflussen, weshalb strenge Vorsichtsmaßnahmen während des Sammelns ergriffen werden müssen, um Unreinheiten im gesammelten Material, die die sTNF-RII Produktion durch Blutzellen stimulieren und somit Serum sTNF-RII 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 Farblösung (TMB) 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 Farblösung (TMB) innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte.
Während der Inkubation mit der Farblösung (TMB) ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

B. Durchführung

- 1. 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.
- 2. Befestigen Sie die Streifen im Halterahmen.
- 3. Pipettieren Sie jeweils 50 µl Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Wells.
- 4. Pipettieren Sie 200 µl Anti-sTNF-RII-MRP-Konjugat in alle Wells.
- 5. Inkubieren Sie 1 Stunde bei Raumtemperatur auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm.
- 6. Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
- 7. Waschen Sie die Platte dreimal:
§ pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jeden Well
§ saugen Sie der Inhalt jedes Wells ab
- 8. Pipettieren Sie 50 µl der Farblösung (TMB) innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jeden Well.
- 9. Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 15 Minuten bei Raumtemperatur auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm; vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
- 10. Pipettieren Sie 200 µl der Stopplösung in jeden Well.
- 11. 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:

- 1. In diesem Fall werden die Daten durch die ELISA-AID™ Software verarbeitet.
- 2. Die Platte wird zunächst bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) ausgewertet.
- 3. Eine zweite Auswertung erfolgt bei 490 nm gegen denselben Referenzfilter.
- 4. Die ELISA-AID™ Software steuert das Lesegerät automatisch und integriert beide Auswertungen in ein polychromatisches Modell. Diese Technik kann ODs bis 10 erstellen.
- 5. Das Prinzip der polychromatischen Datenauswertung funktioniert wie folgt:
§ Xi = OD bei 450 nm
§ Yi = OD bei 490 nm
§ Standard nicht gewichtet lineare Regression, Parameter A & B werden berechnet: Y = A*X + B
§ Wenn Xi < 3 OD Einheiten, dann X berechnet = Xi
§ Wenn Xi > 3 OD Einheiten, dann X berechnet = (Yi-B)/A
§ Die Kalibrationskurve wird unter Verwendung einer 4 Parameter logistischen Kurve erstellt.
§ Die sTNF-RII-Konzentration in den Proben wird durch Interpolation auf der Kalibrationskurve bestimmt.

B. Bichromatische Auswertung:

- 1. Werten Sie die Platte bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) aus.
- 2. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
- 3. Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration sTNF-RII (Abszisse) und zeichnen Sie eine Kalibrationskurve durch die Kalibrationspunkte, indem Sie die eingetragenen Punkte durch gerade Linien verbinden.
- 4. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Kalibrationskurve.
- 5. 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.

sTNF-RII-EASIA		OD Einheiten
		Polychromatisches Modell
Kalibrator	0 ng/ml	0,028
	1,9 ng/ml	0,141
	3,9 ng/ml	0,287
	17 ng/ml	0,926
	48 ng/ml	1,840
	142 ng/ml	3,407

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 0,04 ng/ml.

B. Spezifität

Kreuzreaktionen und Interferenzen werden analysiert durch die Addition verschiedener Analyten zu den sTNF-RII Proben und der Messung der auftretenden sTNF-RII Konzentration.

Analyt	sTNF-RII 2,86 ng/ml (Ratio*)	sTNF-RII 8,85 ng/ml (Ratio*)	sTNF-RII 28,76 ng/ml (Ratio*)
+ sTNF-R1 (p55) (1500 ng/ml)	3,0 ng/ml (104,9 %)	9,08 ng/ml (102,6 %)	29,48 ng/ml (102,5 %)
Analyt	sTNF-RII 0,80 ng/ml (Ratio*)	sTNF-RII 4,36 ng/ml (Ratio*)	sTNF-RII 227,66 ng/ml (Ratio*)
+ TNF-α (500 ng/ml)	0,75 ng/ml (93,8 %)	3,83 ng/ml (87,8 %)	23,63 ng/ml (85,4 %)

Ratio* : $\frac{\text{sTNF-RII gemessen beim Vorhandensein des Analyten} \times 100}{\text{sTNF-RII hinzugefügt ohne den Analyten}}$
Dies demonstriert, dass der sTNF-RII EASIA keine Kreuzreaktion mit sTNF-R1 und dass TNF-α mit dem Assay keine Interferenzen zeigt.

C. Präzision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	3,03 ± 0,06	2,1	A	20	5,2 ± 0,7	13,5
B	9	18,5 ± 0,7	3,7	B	20	16,2 ± 0,8	4,9

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST			
Probe	Zugew. sTNF-RII (ng/ml)	Wiedergef. sTNF-RII (ng/ml)	Wiedergefunden (%)
Serum	0	4,2	-
	3,9	8,4	107,7
	15,4	20,7	106,5
	34,9	39,1	99,7

VERDÜNNUNGSTEST			
Probe	Verdünn.	Theoret. Konz. (ng/ml)	Gemess. Konz. (ng/ml)
Serum	1/1	-	39,1
	1/2	19,5	19,3
	1/4	9,8	9,6
	1/8	4,9	5,1
	1/16	2,4	2,6

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	10 min	20 min	30 min
S1	4,7	5,3	5,1	5,0
S2	3,6	3,9	3,9	2,3
S3	4,3	4,3	3,9	39,3
S4	4,6	4,9	5,4	13,0

- F. **Hook-Effekt**
Eine Probe mit sTNF-RII bis zu 3000 ng/ml liefert höhere Messwerte als der letzte Kalibratormesswert.

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 36 Serumproben augenscheinlich gesunder Personen mit niedrigen CRP Werten, liegen innerhalb der Bandbreite von 0 und 60,2 ng/ml. 35 der 36 Proben enthielten Werte unterhalb 20 ng/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 HCl. 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

- DIETRICH M. and PORZSOLT F. (1992)
Soluble tumor necrosis factor receptors correlate with parasitemia and disease severity in human malaria.
J. Infec. Dis., 166 : 930-934.

- GODFRIED M.H., VAN DER POLL T., JANSEN J., ROMIJN J.A., EEFTINCK-SCHATTENKERK J.K.M., ENDERT E., VAN DEVENTER S.J.H. and SAUERWEIN H.P. (1993)
Soluble receptors for tumor necrosis factor : a putative marker of disease progression in HIV infection.
AIDS, 7 : 33-36.
- RIMANIOL A.C., BOUSSIN F., HERBELIN A., DE GROOTE D., DORMONT D., BACH J.F., DESCAMPS-LATSCHA B. and ZAVALA F. (1994)
Induction of tumor necrosis factor soluble receptor (TNF-sR75) release by HIV adsorption on cultured human monocytes.
Eur. J. Immunol., 24 : 2055-2060.
- HERBELIN A., CHATENAUD L., ROUX-LOMBARD P., DE GROOTE D., LEGENDRE C., DAYER J.M., DESCAMPS-LATSCHA B., KREIS H. and BACH J.F. (1995)
In vivo soluble tumor necrosis factor receptor release in OKT3-treated patients.
Transplantation, 59 : 1470-1475.
- DESCAMPS-LATSCHA B., HERBELIN A., NGUYEN A.T., ROUX-LOMBARD P., ZINGRAFF J., MOYNOT A., VERGER C., DAHMANE D., DE GROOTE D., JUNGERS P. and DAYER J.M. (1995)
Balance between IL-1β, TNF-α and their specific inhibitors in Chronic Renal Failure and maintenance dialysis : relationship with activation markers of T-cells, B-cells and monocytes.
The J. of Immunol., 154 : 882-892.

XVIII.ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	KALIBRATOREN (µl)	PROBE(N) KONTROLLEN (µl)
Kalibratoren (0-5) Proben, Kontrollen Anti-sTNF-RII-MRP Konjugat	50 - 200	- 50 200
1 Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren. Inhalt jedes Wells absaugen. Dreimal mit 400 µl Waschlösung waschen und absaugen.		
Farblösung (TMB)	50	50
15 min. bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren.		
Stopplösung	200	200
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 : KAP1771	Beipackzettelnummer: 1700601/de	Nummer der Originalausgabe: 090506/1
--------------------------------------	------------------------------------	--

	<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
	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 Conjugaat	HRP Konjugat
	HRP Conjugaat	HRP Konjugat
	HRP Conjugaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	HRP Conjugaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	Conjugaat buffer	Konjugatpuffer
	Chromogene TMB geconcentreerd	Chromogenes TMB Konzentrat
	Chromogene Oplossing TMB	Farblösung TMB
	Substraatbuffer	Substratpuffer
	Stopoplossing	Stopplösung
	Incubatieserum	Inkubationsserum
	Buffer	Puffer
	AP Conjugaat	AP Konjugat
	Substraat PNPP	Substrat PNPP
	Geconcentreerd Biotine conjugaat	Biotin-Konjugat-Konzentrat
	Geconcentreerd Avidine-HRP conjugaat	Avidin-HRP-Konzentrat
	Assay buffer	Assaypuffer
	Biotine conjugaat	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 Extração	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	Polyetylenglykol
	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	Immunszorbens
	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		
	Партиден код		
	Каталожен номер		
	Контрол		
	Ин витро диагностично медицинско изделие		
	Производител		
	Съдържание достатъчно за <n> теста		
	Концентриран измиващ разтвор		
	Нулев калибратор		
	Калибратор #		
	Контрол #		
	Трейсър		
	Трейсър		
	Концентриран маркер		
	Концентриран маркер		
	Епруветки		
	Инкубационен буфер		
	Ацетонитрил		
	Серум		
	Разредител за пробите		
	Буфер за разреждане		
	Антисерум		
	Имуноабсорбент		
	Разредител за калибратора		
	Пресъздаващ разтвор		
	Полиетилен гликол		
	Екстрактов разтвор		
	Разтвор за елюиране		
	Силикагелни пълнители		
	Пред-лечебен разтвор		
	Неутрализиращ ратвор		
	Маркерен буфер		
	Микротитърна пластина		
	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза		
	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза		
	HRP конюгиран концентрат		
	HRP конюгиран концентрат		
	Буфер за конюгата		
	Хромогенен TMB концентрат		
	Хромогенен TMB разтвор		
	Субстратен буфер		
	Стоп разтвор		
	Инкубационен серум		
	Буфер		
	AP конюгат / конюгат на алкална фосфатаза		
	Субстрат PNPP / пара нитрофенил фосфат		
	Биотин конюгиран концентрат		
	Авидин HRP концентрат		
	Буфер за пробите		
	Биотин конюгат		
	специфично анти тяло		
	стрептавидин HRP концентрат		
	не специфично свързване		
	второ анти тяло		
	киселинизиращ буфер		