

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



# TNF-alpha human ELISA



**DE4641**



**96**



Demeditec Diagnostics GmbH  
Lise-Meitner-Strasse 2  
24145 Kiel – Germany  
[www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)

**CONTENT / INHALTSVERZEICHNIS / TABELLA DEI CONTENUTI**

1. INTENDED USE .....	4
2. CLINICAL BACKGROUND.....	4
3. PRINCIPLES OF THE METHOD .....	4
4. REAGENTS PROVIDED .....	5
5. SUPPLIES NOT PROVIDED.....	5
6. REAGENT PREPARATION .....	6
7. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS.....	6
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION .....	6
9. PROCEDURE.....	7
10. CALCULATION OF RESULTS.....	8
11. TYPICAL DATA .....	8
12. PERFORMANCE AND LIMITATIONS .....	8
13. INTERNAL QUALITY CONTROL.....	9
14. REFERENCE INTERVALS .....	9
15. PRECAUTIONS AND WARNINGS .....	10
16. BIBLIOGRAPHY .....	10
17. SUMMARY OF THE PROTOCOL.....	10
1. VERWENDUNGSZWECK.....	11
2. KLINISCHER HINTERGRUND .....	11
3. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG.....	11
4. MITGELIEFERTE REAGENZIEN.....	12
5. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL .....	12
6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN.....	13
7. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN .....	13
8. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG.....	13
9. DURCHFÜHRUNG.....	14
10. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE .....	15
11. TYPISCHE WERTE.....	15
12. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK.....	16
13. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE .....	17
14. REFERENZ INTERVALLE .....	17
15. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN.....	17
16. LITERATUR.....	17
17. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS.....	18

---

1. USO DEL KIT .....	19
2. INFORMAZIONI CLINICHE.....	19
3. PRINCIPIO DEL METODO .....	19
4. REATTIVI FORNITI .....	20
5. REATTIVI NON FORNITI .....	20
6. PREPARAZIONE DEI REATTIVI .....	21
7. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI .....	21
8. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI .....	21
9. METODO DEL DOSAGGIO .....	22
10. CALCOLO DEI RISULTATI.....	23
11. CARATTERISTICHE TIPICHE.....	23
12. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO .....	23
13. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO .....	24
14. INTERVALLI DI RIFERIMENTO.....	24
15. PRECAUZIONI PER L'USO .....	25
16. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI .....	25
17. SCHEMA DEL DOSAGGIO.....	26
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS .....	28

## 1. INTENDED USE

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

## 2. CLINICAL BACKGROUND

### A. Biological activities

Human Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) 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- $\alpha$  production by macrophages and TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  may be classified as:

- Antitumoral and growth regulatory activities: TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  strongly inhibits lipoprotein lipase and adipocyte gene expression.

### B. Clinical application

TNF- $\alpha$  has a major pathogenic role: in cachexia associated with chronic infectious or cancerous diseases; in septic shock where the neutralization of TNF- $\alpha$  protects against the associated acute lethality; in graft rejection and graft-versus-host disease; and in parasitic infections where TNF- $\alpha$  may provide some protection but also favours more severe forms of the disease (e.g. the cerebral form of malaria). TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  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).

## 3. PRINCIPLES OF THE METHOD

The TNF- $\alpha$  -ELISA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on microtiterplate. The assay uses monoclonal antibodies (MAbs) directed against distinct epitopes of TNF- $\alpha$ . 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- $\alpha$  – 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- $\alpha$  concentration.

A calibration curve is plotted and TNF- $\alpha$  concentration in samples is determined by interpolation from the calibration curve. The use of the ELISA 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.

**4. REAGENTS PROVIDED**

Reagents	96 tests Kit	Reconstitution
<b>SORB MT</b> Microtiterplate with 96 anti TNF- $\alpha$ (monoclonal antibodies) coated wells	96 wells	<b>Ready</b> for use
<b>ENZ CONJ</b> Conjugate: HRP labelled anti-TNF- $\alpha$ (monoclonal antibodies) in TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin and thymol	1 vial 0.75 ml	<b>Add</b> conjugate buffer (see section 6)
<b>CAL 0 LYO</b> Zero calibrator in human plasma, benzamidin and thymol	2 vials lyophil.	<b>Add</b> distilled water (see on the QC data sheet for the exact volume)
<b>CAL 1 - 5 LYO</b> Calibrator N = 1 to 5 (see exact values on QC data sheet) in human plasma, benzamidin and thymol	5 vials lyophil.	<b>Add</b> 2 ml distilled water
<b>ENZ CONJ DIL</b> Conjugate buffer: TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin, EDTA and thymol	1 vial 6 ml	<b>Ready</b> for use
<b>INC BUF</b> Incubation buffer: TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin, EDTA and thymol	1 vial 6 ml	<b>Ready</b> for use
<b>WASH SOLN 200x</b> Wash Solution (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	<b>Dilute</b> 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
<b>CONTROL 1 &amp; 2 LYO</b> Controls - N = 1 or 2 in human plasma and thymol	2 vials lyophil.	<b>Add</b> 2 ml distilled water
<b>SUB TMB</b> Chromogen TMB (Tetramethylbenzidine)	1 vial 12 ml	<b>Ready</b> for use
<b>STOP SOLN</b> Stopping solution: HCl 1.0N	1 vial 12 ml	<b>Ready</b> for use

**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.

**5. SUPPLIES NOT PROVIDED**

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

1. High quality distilled water
2. Pipettes for delivery of: 50  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1 ml and 10 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Horizontal microtiterplate shaker capable of 700 rpm  $\pm$  100 rpm
6. Washer for microtiterplates
7. 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)

## 6. REAGENT PREPARATION

- A. Calibrators:** Reconstitute the zero calibrator to the volume specified on the QC data sheet 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 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

- 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.

## 7. 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 18 - 25°C 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.

## 8. 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 18 - 25°C. 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.

**9. 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 18 - 25°C 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 12 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**

1. 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.
2. Secure the strips into the holding frame.
3. Pipette 50 µl of incubation buffer into all the wells
4. Pipette 200 µl of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
5. Incubate for 2 hours at 18 - 25°C on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm.
6. Aspirate the liquid from each well.
7. Wash the plate 3 times by:
  - Dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well
  - Aspirating the content of each well
8. Pipette 100 µl of zero calibrator into all the wells
9. Pipette 50 µl of anti- TNF-α -HRP conjugate into all the wells.
10. Incubate for 2 hours at 18 - 25°C on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm.
11. Aspirate the liquid from each well.
12. Wash the plate 3 times by:
  - Dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well
  - Aspirating the content of each well
13. Pipette 100 µl of the revelation solution into each well within 15 minutes following the washing step.
14. Incubate the microtiterplate for 15 minutes at 18 - 25°C on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm, avoid direct sunlight.
15. Pipette 100 µl of Stop solution into each well.
16. Read the absorbencies at 450 nm and 490 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 30 minutes and calculate the results as described in section 10.

## 10. CALCULATION OF RESULTS

### A. Polychromatic Reading:

1. In this case, the software will do the data processing.
2. The plate is first read at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
3. A second reading is performed at 490 nm against the same reference filter.
4. The Software will drive the reader automatically and will integrate both readings into a polychromatic model. This technique can generate OD's up to 10.
5. The principle of polychromatic data processing is as follows:
  - $X_i = \text{OD at 450 nm}$
  - $Y_i = \text{OD at 490 nm}$
  - 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- $\alpha$  concentration in samples is determined by interpolation on the calibration curve.

### B. Bichromatic Reading

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

## 11. TYPICAL DATA

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

TNF- $\alpha$ -ELISA		OD units Poly-chromatic 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

## 12. 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 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TNF- $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF, OSM, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , LIF, MCP-1, G-CSF and RANTES. This TNF- $\alpha$  assay is specific for human natural and recombinant TNF- $\alpha$ .

### 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- $\alpha$ (pg/ml)	Recovered TNF- $\alpha$ (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 Conc. (pg/ml)	Measured Conc. (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

**13. INTERNAL QUALITY CONTROL**

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the QC data sheet, 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 Practises
- 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.

**14. 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.

**15. 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.

**16. BIBLIOGRAPHY**

1. BEUTLER B., CERAMI A. (1987) **Cachectin: more than a tumor necrosis factor**. N. Engl. J. Med., 316; 379-385.
2. 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.
3. 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.
4. AUKRUST P., LIABAKK N-B., MÜLLER F., LIEN E., ESPEVIK T. and FROLAND S.S. (1994) **Serum Levels of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and Soluble TNF Receptors in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection - Correlations to Clinical Immunologic, and Virologic Parameters**. J. Inf. Dis., 169:420-424.
5. 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.
6. 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.

**17. SUMMARY OF THE PROTOCOL**

	<b>CALIBRATORS (<math>\mu</math>l)</b>	<b>SAMPLE(S) CONTROLS (<math>\mu</math>l)</b>
Incubation buffer	50	50
Calibrators (0-5)	200	-
Samples, Controls	-	200
Incubate for 2 hours at 18 - 25°C with continuous shaking at 700 rpm. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 $\mu$ l of Wash Solution and aspirate.		
Zero Calibrator	100	100
Anti-TNF- $\alpha$ -HRP conjugate	50	50
Incubate for 2 hours at 18 - 25°C with continuous shaking at 700 rpm. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 $\mu$ l of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic solution	100	100
Incubate for 15 min at 18 - 25°C with continuous shaking at 700 rpm.		
Stop Solution	100	100
Read on a microtiterplate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (and 490 nm) versus 630 (or 650 nm)		

## 1. VERWENDUNGSZWECK

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

## 2. KLINISCHER HINTERGRUND

### A. Biologische Aktivität

Der humane Tumor-Nekrose-Faktor Alpha (TNF- $\alpha$ ) 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- $\alpha$  Produktion durch Makrophagen und TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  können folgendermaßen charakterisiert werden:

- Antitumoral und wachstumsregulierende Aktivitäten: TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  aktiviert Makrophagen, Neutrophile und Eosinophile genauso 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- $\alpha$  hemmt stark die Lipoproteinlipase und die genetische Expression von Adipozyten

### B. Klinische Anwendungen

TNF- $\alpha$  spielt eine große pathogene Rolle: bei der Kachexie einhergehend mit chronischen Infektionen oder karzinogenen Erkrankungen, beim septischen Schock, wobei die Neutralisation von TNF- $\alpha$  gegen eine drohende akute Lethalität schützt, bei der Abstoßung von Transplantaten sowie der GVH-Erkrankung und bei parasitären Erkrankungen, wobei TNF- $\alpha$  einen gewissen Schutz bietet, aber auch schwere Formen der Krankheit fördern kann (z.B. die zerebrale Form der Malaria). TNF- $\alpha$ , 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- $\alpha$  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).

## 3. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der TNF- $\alpha$ -ELISA ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay (ELISA) im Mikrotiterplattenformat. Der Assay benutzt monoklonale Antikörper (MAbs), die gegen verschiedene Epitope von TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  - MAK 2 - MRP; nicht gebundene enzymbeschriftete Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Gebundene enzymbeschriftete Antikörper werden durch eine Farbreaktion gemessen. Farblösung (TMB - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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- $\alpha$  -Konzentration ist.

Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die TNF- $\alpha$  -Konzentration in den Proben wird durch Interpolation von der Kalibrationskurve bestimmt. Die Verwendung des ELISA-Lesegeräts (Linearität bis zu 3 OD-Einheiten) und eine komplexe Datenreduktionsmethode (polychromatische Datenreduktion) ergeben eine hohe Sensibilität im niedrigen Bereich und einen breiten Kalibrationsbereich.

**4. MITGELIEFERTE REAGENZIEN**

Reagenzien	96 Test Kit	Rekonstitution
<b>SORB</b> <b>MT</b> Mikrotiterplatte mit 96 anti TNF- $\alpha$ - beschichtete Wells (monoklonale Antikörper)	96 Wells	<b>gebrauchsfertig</b>
<b>ENZ</b> <b>CONJ</b> Konjugat: MRP beschriftete Anti- TNF- $\alpha$ (monoklonale Antikörper) in TRIS-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin und Thymol	1 Gefäß 0,75 ml	<b>Konjugatpuffer zugeben</b> (beachten sie Abschnitt 6)
<b>CAL</b> <b>0</b> <b>LYO</b> Null-Kalibrator in Humanplasma mit Benzamidin und Thymol	2 Gefäße lyophilisiert	<b>Dest. Wasser zugeben</b> (das exakte Volumen bitte dem QC Datenblatt entnehmen)
<b>CAL</b> <b>1</b> - <b>5</b> <b>LYO</b> Kalibrator - N = 1 bis 5 (genaue Werte auf QC Datenblatt) in Humanplasma mit Benzamidin und Thymol	5 Gefäße lyophilisiert	2 ml dest. Wasser <b>zugeben</b>
<b>ENZ</b> <b>CONJ</b> <b>DIL</b> Konjugatpuffer: TRIS-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin, EDTA und Thymol	1 Gefäß 6 ml	<b>gebrauchsfertig</b>
<b>INC</b> <b>BUF</b> Inkubationspuffer: TRIS-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin, EDTA und Thymol	1 Gefäß 6 ml	<b>gebrauchsfertig</b>
<b>WASH</b> <b>SOLN</b> <b>200x</b> Waschlösung (Tris-HCl)	1 Gefäß 10 ml	200 x mit dest. Wasser <b>verdünnen</b> (Magnetrührer benutzen).
<b>CONTROL</b> <b>1</b> & <b>2</b> <b>LYO</b> Kontrollen - N = 1 oder 2 Humanplasma mit Thymol	2 Gefäße lyophilisiert	2 ml dest. Wasser <b>zugeben</b>
<b>SUB</b> <b>TMB</b> Chromogenes TMB (Tetramethylbenzidin)	1 Gefäß 12 ml	<b>gebrauchsfertig</b>
<b>STOP</b> <b>SOLN</b> Stopplösung: HCl 1,0N	1 Gefäß 12 ml	<b>gebrauchsfertig</b>

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

**5. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL**

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

1. Hochwertiges destilliertes Wasser
2. Pipetten: 50  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 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  $\pm$  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)

## 6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie den Null-Kalibrator bis zu dem genau auf dem QC Datenblatt 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 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

- 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.

## 7. 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 18 - 25°C 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 - 8°C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

## 8. 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 18 - 25°C 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 TNF-α Produktion durch Blutzellen stimulieren und somit Serum TNF-α Werte fälschlich steigern könnten, zu vermeiden.
- Sammelröhrchen dürfen kein Pyrogen enthalten.

## 9. 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 18 - 25°C.
- 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 12 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

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 50 µl Inkubationspuffer in alle Wells.
4. Pipettieren Sie jeweils 200 µl Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Wells.
5. Inkubieren Sie 2 Stunden bei 18 - 25°C 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 100 µl Null-Kalibrator in alle Wells.
9. Pipettieren Sie 50 µl Anti- TNF-α -MRP-Konjugat in alle Wells.
10. Inkubieren Sie 2 Stunden bei 18 - 25°C auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm.
11. Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
12. Waschen Sie die Platte dreimal:
  - pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jeden Well
  - saugen Sie der Inhalt jedes Wells ab
13. Pipettieren Sie 100 µl der Substratlösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jeden Well.
14. Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 15 Minuten bei 18 - 25°C auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm; vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
15. Pipettieren Sie 100 µl der Stopplösung in jeden Well.
16. Werten Sie die Absorptionen bei 450 nm und 490 nm (Referenzfilter 630 nm oder 650 nm) innerhalb 30 Minuten aus und berechnen Sie die Resultate wie in Abschnitt 10 beschrieben.

**10. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE****A. Polychromatische Auswertung:**

1. In diesem Fall werden die Daten durch die 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 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:
  - $X_i = \text{OD bei 450 nm}$
  - $Y_i = \text{OD bei 490 nm}$
  - 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- $\alpha$  -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 TNF- $\alpha$  (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.

**11. TYPISCHE WERTE**

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

TNF- $\alpha$ -ELISA		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

**12. 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 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TNF- $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF, OSM, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , LIF, MCP-1, G-CSF und RANTES. Dieses TNF- $\alpha$  Assay ist spezifisch für humanes natürliches und rekombinantes TNF- $\alpha$ .

**C. Präzision**

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: Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

**D. Genauigkeit**

## WIEDERFINDUNGSTEST

Probe	Zugeg. TNF- $\alpha$ (pg/ml)	Wiedergef. TNF- $\alpha$ (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. Konz. (pg/ml)	Gemess. Konz. (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.

## ZEITDIFFERENZ

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



### 13. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf dem QC Datenblatt 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.

### 14. REFERENZ INTERVALLE

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.

### 15. 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.

### 16. LITERATUR

1. BEUTLER B., CERAMI A. (1987) **Cachectin: more than a tumor necrosis factor**. N. Engl. J. Med., 316; 379-385.
2. 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.
3. 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.
4. AUKRUST P., LIABAKK N-B., MÜLLER F., LIEN E., ESPEVIK T. and FROLAND S.S. (1994) **Serum Levels of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and Soluble TNF Receptors in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection - Correlations to Clinical Immunologic, and Virologic Parameters**. J. Inf. Dis., 169:420-424.
5. 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.
6. 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.

**17. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS**

	<b>KALIBRATOREN (µl)</b>	<b>PROBE(N) KONTROLLEN (µl)</b>
Inkubationspuffer	50	50
Kalibratoren (0-5)	200	-
Proben, Kontrollen	-	200
2 Stunden bei 18 - 25°C unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren. Inhalt jedes Wells absaugen. Dreimal mit 400 µl Waschlösung waschen und absaugen.		
Null-Kalibrator	100	100
Anti- TNF-α -MRP Konjugat	50	50
2 Stunden bei 18 - 25°C unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren. Inhalt jedes Wells absaugen. Dreimal mit 400 µl Waschlösung waschen und absaugen.		
Chromogene Lösung	100	100
30 min. bei 18 - 25°C unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren.		
Stopplösung	100	100
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.		

## 1. USO DEL KIT

Kit immunoenzimatico per la determinazione quantitativa in vitro del Fattore di Necrosi Tumorale  $\alpha$  umana (TNF- $\alpha$ ) in siero.

## 2. INFORMAZIONI CLINICHE

### A. Attività biologiche

Il Fattore di Necrosi Tumorale Alfa (TNF- $\alpha$ ), 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- $\alpha$  da parte dei macrofagi, inoltre il TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  possono essere classificate come segue:

- Attività antitumorali e regolatorie della crescita: il TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  inibisce fortemente la lipoproteina lipasi e l'espressione genica in adipociti.

### B. Applicazione clinica

Il TNF- $\alpha$  riveste un ruolo patogenetico importante nella cachessia associata a malattie infettive croniche o cancerose, nello shock settico, dove la neutralizzazione del TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  può fornire una protezione ma favorire anche l'insorgenza di forme più gravi della malattia (es. malaria cerebrale). Il TNF- $\alpha$ , 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- $\alpha$  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).

## 3. PRINCIPIO DEL METODO

TNF- $\alpha$  -ELISA 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- $\alpha$ . 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- $\alpha$  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- $\alpha$ .

Viene tracciata una curva di calibrazione e la concentrazione TNF- $\alpha$  nei campioni viene determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione. L'utilizzo del lettore ELISA (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.

**4. REATTIVI FORNITI**

Reattivi	Kit da 96 test	Volume di ricostituzione
<b>SORB MT</b> Piastra di microtitolazione con 96 pozzetti, rivestiti anti TNF- $\alpha$ (anticorpi monoclonali)	96 pozzetti	Pronte per l'uso
<b>ENZ CONJ</b> Coniugato: anti- TNF- $\alpha$ (anticorpi monoclonali) marcato con HRP in tampone TRIS-maleato con albumina di siero bovino e timolo	1 flacone 0,75 ml	<b>Aggiungere</b> il tampone del coniugato (vedi paragrafo 6)
<b>CAL 0 LYO</b> Calibratore Zero: plasma umano con benzamidina e timolo	2 flaconi liofiliz	<b>Aggiungere</b> acqua distillata (vedi QC data sheet per volume esatto)
<b>CAL 1 - 5 LYO</b> Calibratore N= 1-5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle QC data sheet) in plasma umano con benzamidina e timolo.	5 flaconi liofiliz.	Aggiungere 2 ml di acqua distillata
<b>ENZ CONJ DIL</b> Tampone del coniugato: tampone TRIS-maleato con albumina di siero bovino, EDTA e timolo.	1 flacone 6 ml	Pronte per l'uso
<b>INC BUF</b> Tampone di incubazione: tampone TRIS-maleato con albumina di siero bovino, EDTA e timolo	1 flacone 6 ml	Pronte per l'uso
<b>WASH SOLN 200x</b> Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	1 flacone 10 ml	Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico)
<b>CONTROL 1 &amp; 2 LYO</b> Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano e timolo	2 flaconi liofiliz.	Aggiungere 2 ml di acqua distillata
<b>SUB TMB</b> Soluzione Cromogena TMB (tetrametilbenzidina)	1 flacone 12 ml	Pronte per l'uso
<b>STOP SOLN</b> Soluzione di arresto: HCl 1.0N	1 flacone 12 ml	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.

**5. 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  $\mu$ l, 200  $\mu$ 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).

## 6. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. Calibratore:** Ricostituire il calibratore zero con acqua distillata fino al volume indicato sulle QC data sheet 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- $\alpha$  -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 $\mu$ l	500 $\mu$ l	550 $\mu$ l
16	100 $\mu$ l	1000 $\mu$ l	1100 $\mu$ l
24	150 $\mu$ l	1500 $\mu$ l	1650 $\mu$ l
32	200 $\mu$ l	2000 $\mu$ l	2200 $\mu$ l
48	300 $\mu$ l	3000 $\mu$ l	3300 $\mu$ l
96	600 $\mu$ l	6000 $\mu$ l	6600 $\mu$ 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.

## 7. 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 18 - 25°C 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.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

## 8. 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 18 - 25°C. 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- $\alpha$  da parte delle cellule ematiche con conseguente aumento falsato dei livelli sierici di TNF- $\alpha$ .
- Le provette di raccolta devono essere apirogene.

## 9. 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 18 - 25°C.
- 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 12, 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

1. 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.
2. Assicurare le strisce reagenti nel telaio di supporto.
3. Pipettare 50 µl di Tampone di Incubazione in ogni pozzetto
4. Pipettare 200 µl di ogni calibratore, controllo e campione nei pozzetti adeguati.
5. Incubare per 2 ore a 18 - 25°C su agitatore orizzontale regolato a 700 ± 100 rpm.
6. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
7. Lavare la piastra 3 volte :
  - versando 0,4 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
  - aspirando il contenuto di ogni pozzetto
8. Pipettare 100 µl del calibratore zero in tutti i pozzetti.
9. Pipettare 50 µl di coniugato anti- TNF-α –HRP in tutti i pozzetti.
10. Incubare per 2 ore a 18 - 25°C su agitatore orizzontale regolato a 700 ± 100 rpm.
11. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
12. Lavare la piastra 3 volte :
  - versando 0,4 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
  - aspirando il contenuto di ogni pozzetto
13. Pipettare 100 µl della soluzione di rivelazione preparata di fresco in ogni pozzetto entro 15 minuti dal termine della fase di lavaggio.
14. Incubare la piastra di microtitolazione per 15 minuti a 18 - 25°C su un agitatore orizzontale a 700 ± 100 rpm; evitare la luce diretta del sole.
15. Pipettare 100 µl di soluzione di arresto in ogni pozzetto.
16. Leggere le assorbanze a 450 nm a 490 nm (filtro di riferimento a 630 nm o 650 nm) entro 30 minuti e calcolare i risultati come descritto nella sezione 10.

## 10. CALCOLO DEI RISULTATI

### A. Lettura policromatica:

1. In questo caso, l'elaborazione dati verrà effettuata dal software.
2. La piastra viene letta a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
3. Verrà quindi effettuata una seconda lettura a 490 nm rispetto allo stesso filtro di riferimento.
4. Il Software guiderà automaticamente il lettore e integrerà le due letture utilizzando un modello policromatico. Tale tecnica può generare valori fino a 10 OD.
5. Il principio dell'elaborazione policromatica dei dati è la seguente:
  - $X_i = \text{OD a } 450 \text{ nm}$
  - $Y_i = \text{OD a } 490 \text{ nm}$
  - 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- $\alpha$  nel campione viene determinata per interpolazione sulla curva di calibrazione.

### B. Lettura bicromatica

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

## 11. 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- $\alpha$ -ELISA		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

## 12. 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-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TNF- $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF, OSM, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , LIF, MCP-1, G-CSF e RANTES. Tale test per il dosaggio del TNF- $\alpha$  è specifico per il TNF- $\alpha$  naturale e ricombinante umano.

### C. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> $\pm$ SD (pg/ml)	CV (%)	Siero	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 : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

**D. Accuratezza**

## TEST DI RECUPERO

Campione	TNF- $\alpha$ aggiunta (pg/ml)	TNF- $\alpha$ 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	Conc. teorica (pg/ml)	Conc. 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

**13. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO**

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sulle QC data sheet, 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.

**14. 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.



## 15. 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 HCl.

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.

## 16. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI












1. BEUTLER B., CERAMI A. (1987) **Cachectin : more than a tumor necrosis factor**. N. Engl. J. Med., 316 ; 379-385.
2. 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.
3. 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.
4. AUKRUST P., LIABAKK N-B., MÜLLER F., LIEN E., ESPEVIK T. and FROLAND S.S. (1994) **Serum Levels of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and Soluble TNF Receptors in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection - Correlations to Clinical Immunologic, and Virologic Parameters**. J. Inf. Dis., 169:420-424.
5. 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.
6. 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.

**17.SCHEMA DEL DOSAGGIO**

	<b>CALIBRATORE (<math>\mu</math>l)</b>	<b>CAMPIONI CONTROLLI (<math>\mu</math>l)</b>
Tampone di Incubazione	50	50
Calibratore (0 - 5)	200	-
Campioni, controlli	-	200
Incubare per 2 ore a 18 - 25°C in agitazione continua a 700 rpm. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 400 $\mu$ l di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Calibratore Zero	100	100
Coniugato Anti-TNF- $\alpha$ -HRP	50	50
Incubare per 2 ore a 18 - 25°C in agitazione continua a 700 rpm. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 400 $\mu$ l di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Soluzione cromogenica	100	100
Incubare per 15 minuti a 18 - 25°C in agitazione continua a 700 rpm.		
Soluzione di arresto	100	100
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)		



## SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta