

# Product information

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



User's Manual

# IFN-gamma human ELISA

Enzyme immunoassay for the quantitative measurement of human interferon gamma (IFN-gamma) in serum and plasma



**DE4434**



**96 wells**

## 1. INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the in vitro quantitative measurement of human interferon gamma (IFN-gamma) in serum and plasma.

## 2. CLINICAL BACKGROUND

### A. Biological activities

IFN- $\gamma$  (type 2, immune IFN) is structurally and functionally distinct from type 1 (alpha/beta) interferon and acts on a separate receptor. Only one IFN- $\gamma$  gene has been identified, coding for a 146 AA protein that is post-translationally processed into two glycosylated species of 20 and 25 Kd. Native IFN- $\gamma$  is pH2-labile, highly basic, and can aggregate to form dimers that are biologically active. IFN- $\gamma$  is a real lymphokine produced by activated T (and NK) cells. Despite its clear antiviral and cellular growth regulating activities, its immunomodulatory properties are believed to be the most important. IFN- $\gamma$  is the principal activator of macrophage function (Macrophage Activating Factor, MAF), and it also regulates the pathway of differentiation of myeloid cells. It plays an important role in the growth and differentiation of cytotoxic (and possibly suppressor) T cells, activates NK cells and acts as a B cell maturation factor. It regulates Ig isotype production and inhibits IgE responses. One of the modes of action of IFN- $\gamma$  is to induce the expression of membrane proteins, such as class 1 and class 2 MHC antigens and adhesion molecules on various cell types, high affinity Fc receptors for IgG on myelomonocytic cells, etc. Integrated in the cytokine network, IFN- $\gamma$  interacts with other cytokines, in either a synergistic (e.g. TNF) or antagonistic (e.g. IL-4) way.

### B. Clinical application

The precise role of IFN- $\gamma$  in human diseases and therapy is still poorly defined. Clearly, it is involved in the defense against parasites, intercellular pathogens and possibly tumour cells. Its therapeutic administration partially corrects the deficient immune response observed in lepromatous leprosy and the phagocyte defect of patients with X-Linked chronic granulomatous disease. A deficiency in IFN- $\gamma$  production has been related to persistent (e.g. EBV) viral infections, and a correlation could be established between the secretion of IFN- $\gamma$  by peripheral blood mononuclear cells during an herpetic infection and the time of a next recurrence. A defect in IFN- $\gamma$  production has also been recorded in several primary or secondary immunodeficiency states. IFN- $\gamma$  is seldom detected in the serum of healthy persons. Its production may be demonstrated "in situ" in several inflammatory disorders (Sarcoidosis, rheumatoid-arthritis, subacute thyroiditis, polymyositis, multiple sclerosis). Higher levels of serum IFN- $\gamma$  are measured during severe parasitic diseases (e.g. Plasmodium Falciparum malaria); during cytokine (IL-2) therapy; and after the first injections of OKT3.

## 3. PRINCIPLES OF THE METHOD

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

A calibration curve is plotted and IFN- $\gamma$  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 IFN- $\gamma$ (monoclonal antibodies) coated wells	96 wells	<b>Ready</b> for use
<b>ENZ CONJ</b> Conjugate: HRP labelled anti-IFN- $\gamma$ (monoclonal antibodies) in TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin and thymol	1 vial 6 ml	<b>Ready</b> for use
<b>CAL 0</b> Zero calibrator in human serum, benzamidin and thymol	1 vial lyophil.	<b>Add</b> distilled water (see on the QC data sheet for the exact volume)
<b>CAL 1 - 5</b> Calibrator N = 1 to 5 (see exact values on QC data sheet) in human serum, benzamidin and thymol	5 vials lyophil.	<b>Add</b> 0.5 ml distilled water
<b>WASH SOLN 200x</b> Wash Solution (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	<b>Dilute</b> 200x with distilled water (use a magnetic stirrer).
<b>CONTROL 1 &amp; 2</b> Controls - N = 1 or 2 in human serum, benzamidin and thymol	2 vials lyophil.	<b>Add</b> 0.5 ml distilled water
<b>SUB TMB</b> Chromogenic TMB (Tetramethylbenzidine)	1 vial 12 ml	<b>Ready</b> for use
<b>STOP SOLN</b> Stop Solution: HCl 1.0N	1 vial 12 ml	<b>Ready</b> for use

**Note:** 1. Use the zero calibrator for sample dilutions.  
2. 1 IU of the calibrator preparation is equivalent to 1 IU of the NIBSC Reference Reagent 87/586.

**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)
8. Optional equipment: The ELISA-AID™ necessary to read the plate according to polychromatic reading (see paragraph 10.A.) can be purchased from Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

**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 0.5 ml distilled water.
- B. Controls:** Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- C. 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 18-28°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 18-28°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 IFN- $\gamma$  production by blood cells and thus falsely increase plasma IFN- $\gamma$  values.
- Collection tubes must be pyrogen-free. Plasma can be collected on sterile EDTA and rapidly separated after centrifugation. The use of heparin tubes is discouraged as batches of heparin are often contaminated with pyrogen.

## 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 18-28°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 each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
4. Pipette 50 µl of anti-IFN-γ-HRP conjugate into all the wells.
5. Incubate for 2 hours at 18-28°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 the chromogenic Solution into each well within 15 minutes following the washing step.
9. Incubate the microtiterplate for 15 minutes at 18-28°C on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm, avoid direct sunlight.
10. Pipette 100 µl of Stop Solution into each well.
11. 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 ELISA-AID™ 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 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.
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 IFN-γ 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 IFN-γ (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.

	IFN-γ-ELISA	OD units Polychromatic model
Calibrator	0 IU/ml	0.03
	1 IU/ml	0.173
	2 IU/ml	0.339
	5 IU/ml	0.700
	10 IU/ml	1.353
	30 IU/ml	3.107

**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 0.03 IU/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- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\beta$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF, OSM, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , LIF, MCP-1, G-CSF and RANTES. This IFN- $\gamma$  assay is specific for human natural and recombinant IFN- $\gamma$ .

**C. Precision**

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> $\pm$ SD (IU/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> $\pm$ SD (IU/ml)	CV (%)
A	10	1.26 $\pm$ 0.03	3.2	A	20	1.61 $\pm$ 0.03	5.8
B	10	12.28 $\pm$ 0.35	3.8	B	20	5.72 $\pm$ 0.51	8.8

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

**D. Accuracy**

## RECOVERY TEST

Sample	Added IFN- $\gamma$ (IU/ml)	Recovered IFN- $\gamma$ (IU/ml)	Recovery (%)
Serum	20.5	20.3	99
	9.9	10.1	103
	4.7	4.8	101
	2.4	2.3	94
	1.0	1.0	99
Plasma	20.5	19.6	96
	9.9	9.5	97
	4.7	4.8	102
	2.4	2.4	101
	1.0	1.0	96

## DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Conc. (IU/ml)	Measured Conc. (IU/ml)
Serum	1/1	-	18.0
	1/2	9.0	8.1
	1/4	4.5	4.4
	1/8	2.3	2.4
	1/16	1.1	1.3
	1/32	0.6	0.6
Plasma	1/1	-	11.7
	1/2	5.9	5.9
	1/4	2.9	3.2
	1/8	1.5	1.6
	1/16	0.7	0.8
	1/32	0.4	0.4

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	10 min	20 min	30 min
S1	2.7	2.7	2.7	2.7
S2	6.8	6.8	6.5	6.7
S3	4.2	4.1	4.0	4.0
N1	22.7	21.2	19.4	22.0
N2	24.9	23.7	21.7	20.1
N3	14.7	14.8	13.1	12.6
N4	17.9	15.3	13.8	13.9
N5	17.4	16.5	15.6	15.0

**F. Hook effect**

A sample spiked with IFN- $\gamma$  up to 500 000 IU/ml gives higher OD's than the last calibrator point.

**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 mean of 30 normal serum samples was 0.28 IU/ml (SD = 0.15), ranging between 0 IU/ml and 0.77 IU/ml. This study was performed on samples from apparently healthy persons with low CRP levels.

The mean of 60 normal plasma, collected in strict sampling conditions, was 0.08 IU/ml (SD = 0.12), ranging between 0 IU/ml and 0.89 IU/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. GUERRY D., ALEXANDER M.A., ELDER D.E. and HERLYN M.F. (1987) **IFN- $\gamma$  regulated the T cell response to precursor nevi and biologically early melanoma.** J. Immunol., 139 : 305-312.
2. LANDOLFO S., COFANO F., GIOVARELLI M., PRAT M., CAVALLO G. and FORNI G. (1985) **Inhibition of IFN- $\gamma$  may suppress allograft reactivity by T lymphocytes in vitro and in vivo.** Sci., 119 : 176-179.
3. MURRAY H.W. (1988) **Interferon gamma, the activated macrophage and host defense against microbial challenge.** Ann. Int. Med. , 108 : 595-608.
4. NATHAN C.F., KAPLAN G., LEVIS W.R., NUSRAT A., WITMER M.D., SHERWIN S.A., JOB C.K., HOROWITZ C.R., STEINMAN R.M. and COHN Z.A. (1986) **Local and systemic effects of intradermal rIFN gamma in patients with lepromatous leprosy.** N. Engl. J. Med., 315 : 6-12.
5. SNAPPER C.M. and PAUL W.E. (1987) **IFN- $\gamma$  and BSF-1 reciprocally regulate Ig Isotope production.** Sci., 236 : 944-946.
6. SUZUKI Y., ORELLANA M.A., SCHREIBER R.D. and REMINGTON J.S. (1988) **Interferon gamma : the major mediator of resistance against Toxoplasma gondii.** Sci., 240 : 516-518

**17. SUMMARY OF THE PROTOCOL**

	<b>CALIBRATORS (<math>\mu</math>l)</b>	<b>SAMPLE(S) CONTROLS (<math>\mu</math>l)</b>
Calibrators (0-5)	50	-
Samples, Controls	-	50
Anti-IFN- $\gamma$ -HRP conjugate	50	50
Incubate for 2 hours at 18-28°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 18-28°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 immunenzymatisches Assay für die quantitative in vitro Bestimmung von humanem Interferon-gamma (IFN-gamma) in Serum und Plasma.

## 2. KLINISCHER HINTERGRUND

### A. Biologische Aktivität

IFN- $\gamma$  (Typ II, Immuninterferon) unterscheidet sich strukturell und funktionsgemäß von Typ I (alpha/beta) Interferon und wirkt auf einen separaten Rezeptor ein. Nur ein IFN- $\gamma$  Gen konnte identifiziert werden, codiert für ein 146 AA Protein, das posttranslational prozessiert ist in zwei glykolytierte Einheiten von 20 und 25 Kd. Natives IFN- $\gamma$  ist pH2-labil, hoch basisch und kann die Bildung von Dimeren, die biologisch aktiv sind, aggregieren. IFN- $\gamma$  ist ein wirkliches Lymphokin, das von aktivierten T- (und NK-) Zellen produziert wird. Ungeachtet seiner klaren antiviralen und Zellwachstum regulierenden Aktivitäten, werden seine immunmodulatorischen Fähigkeiten als die bedeutendsten angesehen. IFN- $\gamma$  ist der Hauptaktivator der Makrophagenfunktion (Makrophagen-aktivierender Faktor, MAF), und es reguliert ebenso den Weg der Differenzierung der myeloischen Zellen. Es spielt eine wichtige Rolle bei Wachstum und Differenzierung zytotoxischer (und möglicherweise suppressiver) T-Zellen, aktiviert NK-Zellen und fungiert als B-Zellen Maturationsfaktor. Es reguliert die Produktion von Ig Isotyp und hemmt die IgE Antworten. Weitere Wirkweisen des IFN- $\gamma$  bestehen darin, dass es die Expression von Membranproteinen, solche wie Klasse I und Klasse II der MHC Antigene, induziert ebenso wie die Adhäsionsmoleküle bei verschiedenen Zelltypen und „high affinity“ Fc-Rezeptoren für IgG bei myelomonocytierten Zellen etc. Integriert im Zytokin-Netzwerk interagiert IFN- $\gamma$  mit anderen Zytokinen, zum einen mit synergistischem (z.B. TNF) zum andern mit antagonistischem Effekt (z.B. IL-4).

### B. Klinische Anwendung

Die präzise Rolle des IFN- $\gamma$  bei humanen Krankheiten und Therapien ist noch wenig definiert. Zweifelsfrei ist es in die Abwehr gegen Parasiten, interzelluläre Pathogene und möglicherweise gegen Tumorzellen involviert. Unter therapeutischer Gabe wurde bei Lepra lepromatosa tuberosa und bei dem Phagozytendefekt von Patienten mit x-chromosomaler progressiv-septischer Granulomatose eine teilweise Korrektur der defizitären Immunantwort beobachtet. Eine defizitäre IFN- $\gamma$  Produktion konnte mit persistierenden Virusinfektionen (z.B. EBV) in Verbindung gebracht werden und es konnte eine Korrelation zwischen der Sekretion von IFN- $\gamma$  durch mononukleare Zellen im peripheren Blut während einer herpetischen Infektion und der Zeit bis zum nächsten Rückfall festgestellt werden. Ein Defekt bei der IFN- $\gamma$  Produktion wurde ebenso bei verschiedenen primären oder sekundären Stadien eines Immundefekts festgestellt. IFN- $\gamma$  wird selten im Serum gesunder Personen nachgewiesen. Seine Produktion könnte "in situ" bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen (Besnier-Boeck-Schaumann-Krankheit, rheumatoide Arthritis, subakute Schilddrüsenentzündung, Neurumyositis, multiple Sklerose) demonstriert werden. Höhere Serumwerte von IFN- $\gamma$  wurden während schwerer Parasitenerkrankungen (z.B. Plasmodium Falciparum malaria), während einer Therapie mit Zytokinen (IL-2) und nach der ersten Injektion von OKT3 gemessen.

## 3. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der IFN- $\gamma$ -ELISA ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay (ELISA) im Mikrotiterplattenformat. Der Assay benutzt monoklonale Antikörper (MAbs), die gegen verschiedene Epitope von IFN- $\gamma$  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 - IFN- $\gamma$  - MAk 2 - MRP; nicht gebundene enzymschriebene Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Gebundene enzymschriebene 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 IFN- $\gamma$ -Konzentration ist. Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die IFN- $\gamma$ -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 IFN- $\gamma$ - beschichtete Wells (monoklonale Antikörper)	96 Wells	<b>gebrauchsfertig</b>
<b>ENZ</b> <b>CONJ</b> Konjugat: MRP beschriftete Anti-IFN- $\gamma$ (monoklonale Antikörper) in TRIS-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin und Thymol	1 Gefäß 6 ml	<b>gebrauchsfertig</b>
<b>CAL</b> <b>0</b> Null-Kalibrator in Humanserum mit Benzamidin und Thymol	1 Gefäß lyophilisiert	<b>Dest. Wasser zugeben</b> (das exakte Volumen bitte dem QC Datenblatt entnehmen)
<b>CAL</b> <b>1 – 5</b> Kalibrator - N = 1 bis 5 (genaue Werte auf QC Datenblatt) in Humanserum mit Benzamidin und Thymol	5 Gefäße lyophilisiert	0,5 ml dest. Wasser <b>zugeben</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 &amp; 2</b> Kontrollen - N = 1 oder 2 Humanserum mit Benzamidin und Thymol	2 Gefäße lyophilisiert	0,5 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 IU der Kalibratorzubereitung ist äquivalent zu 1 IU des NIBSC Referenz Reagenz 87/586.

#### 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)
8. Optional: ELISA-AID™ zur Auswertung der Platte nach polychromatischer Methode (siehe Abschnitt 10.A.), erhältlich bei Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

## 6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie den Null-Kalibrator bis zu dem genau auf dem QC Datenblatt Volumen mit dest. Wasser, 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.

## 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 18-28°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° bis 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 -20°C für maximal 2 Monate gelagert werden. Eine längere Lagerdauer (maximal 1 Jahr) erfordert eine Lagerung bei -70°C.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Vor Gebrauch müssen alle Proben 18-28°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 IFN- $\gamma$  Produktion durch Blutzellen stimulieren und somit Plasma IFN- $\gamma$  Werte fälschlich steigern könnten, zu vermeiden.
- Sammelröhrchen dürfen kein Pyrogen enthalten. Plasma kann mit sterilen EDTA gesammelt und nach der Zentrifugation schnell getrennt werden. Vom Gebrauch von Heparin-Röhrchen wird abgeraten, da Heparin-Chargen des Öfteren mit Pyrogen kontaminiert sind.

## 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 18-28°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 jeweils 50 µl Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Wells.
4. Pipettieren Sie 50 µl Anti-IFN-γ-MRP-Konjugat in alle Wells.
5. Inkubieren Sie 2 Stunden bei 18-28°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 der Substratlösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jeden Well.
9. Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 15 Minuten bei 18-28°C auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm; vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
10. Pipettieren Sie 100 µl der Stopplösung in jeden Well.
11. 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 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:
  - $X_i = \text{OD bei } 450 \text{ nm}$
  - $Y_i = \text{OD bei } 490 \text{ nm}$
  - 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 IFN- $\gamma$ -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 IFN- $\gamma$  (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.

IFN- $\gamma$ -ELISA		OD Einheiten Polychromatisches Modell
Kalibrator	0 IU/ml	0,03
	1 IU/ml	0,173
	2 IU/ml	0,339
	5 IU/ml	0,700
	10 IU/ml	1,353
	30 IU/ml	3,107

**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 0,03 IU/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- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\beta$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF, OSM, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , LIF, MCP-1, G-CSF und RANTES. Dieses IFN- $\gamma$  Assay ist spezifisch für humanes natürliches und rekombinantes IFN- $\gamma$ .

**C. Präzision**

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (IU/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (IU/ml)	CV (%)
A	10	1,26 ± 0,03	3,2	A	20	1,61 ± 0,03	5,8
B	10	12,28 ± 0,35	3,8	B	20	5,72 ± 0,51	8,8

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

**D. Genauigkeit**

WIEDERFINDUNGSTEST			
Probe	Zugew. IFN-γ (IU/ml)	Wiedergef. IFN-γ (IU/ml)	Wiedergefunden (%)
Serum	20,5	20,3	99
	9,9	10,1	103
	4,7	4,8	101
	2,4	2,3	94
	1,0	1,0	99
Plasma	20,5	19,6	96
	9,9	9,5	97
	4,7	4,8	102
	2,4	2,4	101
	1,0	1,0	96
VERDÜNNUNGSTEST			
Probe	Verdünn.	Theoret. Konz. (IU/ml)	Gemess. Konz. (IU/ml)
Serum	1/1	-	18,0
	1/2	9,0	8,1
	1/4	4,5	4,4
	1/8	2,3	2,4
	1/16	1,1	1,3
	1/32	0,6	0,6
Plasma	1/1	-	11,7
	1/2	5,9	5,9
	1/4	2,9	3,2
	1/8	1,5	1,6
	1/16	0,7	0,8
	1/32	0,4	0,4

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	2,7	2,7	2,7	2,7
S2	6,8	6,8	6,5	6,7
S3	4,2	4,1	4,0	4,0
N1	22,7	21,2	19,4	22,0
N2	24,9	23,7	21,7	20,1
N3	14,7	14,8	13,1	12,6
N4	17,9	15,3	13,8	13,9
N5	17,4	16,5	15,6	15,0

**F. Hook-Effekt**

Eine Probe mit IFN-γ bis zu 500 000 IU/ml liefert höhere Messwerte als der letzte Kalibratormesswert.

### 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: Der Mittelwert von 30 normalen Serumproben lag bei 0,28 IU/ml (SD = 0,15), Werte zwischen 0 IU/ml und 0,77 IU/ml. Diese Studie wurde durchgeführt mit Proben von anscheinend gesunden Personen mit niedrigen CRP Werten.

Der Mittelwert von 60 normalen Plasmaproben, gesammelt unter strengen Sammelbedingungen lag bei 0,08 IU/ml (SD = 0,12), Werte zwischen 0 IU/ml und 0,89 IU/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. GUERRY D., ALEXANDER M.A., ELDER D.E. and HERLYN M.F. (1987) **IFN- $\gamma$  regulated the T cell response to precursor nevi and biologically early melanoma.** J. Immunol., 139 : 305-312.
2. LANDOLFO S., COFANO F., GIOVARELLI M., PRAT M., CAVALLO G. and FORNI G. (1985) **Inhibition of IFN- $\gamma$  may suppress allograft reactivity by T lymphocytes in vitro and in vivo.** Sci., 119 : 176-179.
3. MURRAY H.W. (1988) **Interferon gamma, the activated macrophage and host defense against microbial challenge.** Ann. Int. Med. , 108 : 595-608.
4. NATHAN C.F., KAPLAN G., LEVIS W.R., NUSRAT A., WITMER M.D., SHERWIN S.A., JOB C.K., HOROWITZ C.R., STEINMAN R.M. and COHN Z.A. (1986) **Local and systemic effects of intradermal rIFN gamma in patients with lepromatous leprosy.** N. Engl. J. Med., 315 : 6-12.
5. SNAPPER C.M. and PAUL W.E. (1987) **IFN- $\gamma$  and BSF-1 reciprocally regulate Ig Isotope production.** Sci., 236 : 944-946.
6. SUZUKI Y., ORELLANA M.A., SCHREIBER R.D. and REMINGTON J.S. (1988) **Interferon gamma : the major mediator of resistance against Toxoplasma gondii.** Sci., 240 : 516-518

**17. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS**

	<b>KALIBRATOREN (<math>\mu</math>l)</b>	<b>PROBE(N) KONTROLLEN (<math>\mu</math>l)</b>
Kalibratoren (0-5)	50	-
Proben, Kontrollen	-	50
Anti-IFN- $\gamma$ -MRP Konjugat	50	50
2 Stunden bei 18-28°C unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren. Inhalt jedes Wells absaugen. Dreimal mit 400 $\mu$ l Waschlösung waschen und absaugen.		
Substratlösung	100	100
15 min. bei 18-28°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 immunoenzimetrico per la determinazione quantitativa in vitro dell'interferone gamma (IFN- $\gamma$ ) umano in siero e plasma.

## 2. INFORMAZIONI CLINICHE

### A. Attività biologiche

L'IFN- $\gamma$  (di tipo 2, IFN immune) è strutturalmente e funzionalmente differente dall'interferone di tipo 1 (alfa/beta) ed agisce su un diverso recettore. È stato identificato un solo gene IFN- $\gamma$ , codificante una proteina di 146 aa post-traslazionalmente scissa in due forme glicosilate, rispettivamente di 20 e 25 kD. L'IFN- $\gamma$  nativo è altamente basico e labile a pH 2, e può aggregarsi dando luogo alla formazione di dimeri biologicamente attivi. L'IFN- $\gamma$  è una vera linfochina prodotta da linfociti T (e NK) attivati. Il suo effetto immunomodulatorio, che si aggiunge alle accertate attività antivirale e regolatoria della proliferazione cellulare, è la sua caratteristica principale. L'IFN- $\gamma$  è il principale attivatore della funzione macrofagica (Fattore Attivante i Macrofagi, MAF) e regola il processo di differenziazione delle cellule mieloidi. Gioca inoltre un ruolo importante nella crescita e nella differenziazione dei linfociti T citotossici (e probabilmente soppressori), attiva i linfociti NK ed agisce come fattore di maturazione dei linfociti B. Regola altresì la produzione dei diversi isotipi di Ig e inibisce la risposta delle IgE. Una delle modalità di azione dell'IFN- $\gamma$  è l'induzione dell'espressione di proteine di membrana quali gli antigeni MHC di classe I e II, molecole di adesione su diversi tipi cellulari e recettori Fc ad alta affinità per IgG su cellule mielomonocitiche, ecc. Integrato nel sistema citochinico, l'IFN- $\gamma$  interagisce con altre citochine secondo un meccanismo sinergico (es. TNF) o antagonistico (es. IL-4).

### Applicazione clinica

Sebbene nell'uomo il ruolo preciso dell'IFN- $\gamma$  in ambito diagnostico e terapeutico sia ancora scarsamente delineato, è comunque evidente un suo coinvolgimento nella difesa contro parassiti, patogeni intracellulari e probabilmente cellule tumorali. La sua somministrazione terapeutica corregge parzialmente la risposta immunitaria insufficiente evidenziabile in casi di lebbra lepromatosa, nonché il deficit fagocitico osservabile in pazienti con malattia granulomatosa cronica X-collegata. La correlazione tra deficit nella produzione di IFN- $\gamma$  e presenza di un'infezione virale persistente (es. EBV) è stata già osservata, mentre ancora da accertarsi è quella tra secrezione di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule ematiche mononucleate periferiche in corso di infezione erpetica e tempo di comparsa di una recidiva. Un deficit nella produzione di IFN- $\gamma$  è stato evidenziato anche in diversi casi di immunodeficienza primaria o secondaria. Raramente è rilevabile una presenza di IFN- $\gamma$  nel siero di soggetti sani. Una sua produzione può essere dimostrata "in situ" nel corso di molti disordini infiammatori (sarcoideosi, artrite reumatoide, tiroidite subacuta, polimiosite, sclerosi multipla). Un aumento dei livelli sierici di IFN- $\gamma$  è osservabile nel corso di malattie parassitarie gravi (es. malaria da *Plasmodium falciparum*), durante la terapia a base di citochine (IL-2) e dopo le prime iniezioni di OKT3.

## 3. PRINCIPIO DEL METODO

IFN- $\gamma$ -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 dell'IFN- $\gamma$ . 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 – IFN- $\gamma$  umano - 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 IFN- $\gamma$ .

Viene tracciata una curva di calibrazione e la concentrazione IFN- $\gamma$  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 IFN- $\gamma$ (anticorpi monoclonali)	96 pozzetti	Pronte per l'uso
<b>ENZ CONJ</b> Coniugato: anti-IFN- $\gamma$ (anticorpi monoclonali) marcato con HRP in tampone TRIS-maleato con albumina di siero bovino e timolo	1 fialone 6 ml	Pronte per l'uso
<b>CAL 0</b> Calibratore Zero: siero umano con benzamidina e timolo	1 fialone liofiliz.	<b>Aggiungere</b> acqua distillata (vedi QC data sheet per volumi esatti)
<b>CAL 1 - 5</b> Calibratore N= 1-5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle QC data sheet), in siero umano con benzamidina e timolo	5 fialoni liofiliz.	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata
<b>WASH SOLN 200x</b> Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	1 fialone 10 ml	Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico)
<b>CONTROL 1 &amp; 2</b> Controlli: N = 1 o 2, in siero umano con benzamidina e timolo	2 fialoni liofiliz.	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata
<b>SUB TMB</b> Soluzione Cromogena TMB (tetrametilbenzidina)	1 fialone 12 ml	Pronto per l'uso
<b>STOP SOLN</b> Soluzione di arresto: HCl 1.0N	1 fialone 12 ml	Pronto per l'uso

Note: 1. Usare lo Calibratore Zero per diluire i campioni.

2. 1 IU della preparazione standard è equivalente a 1 IU del Reagente di Riferimento NIBSC 87/586.

**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).
8. Strumentazione aggiuntiva: l' ELISA-AID™ necessario per la lettura policromatica delle piastre (vedi paragrafo 10.A) è acquistabile presso Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

**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 0,5 ml di acqua distillata.
- B. Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
- C. 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 18-28°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 18-28°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 IFN- $\gamma$  da parte delle cellule ematiche con conseguente aumento falsato dei livelli sierici di IFN- $\gamma$ .
- Le provette di raccolta devono essere apirogene. Il plasma può essere raccolto in provette sterili con EDTA e rapidamente separato dopo centrifugazione. L'utilizzo di provette contenenti eparina è sconsigliabile in considerazione della frequente contaminazione pirogenica dei lotti di eparina.

## 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 18-28°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 ogni calibratore, controllo e campione nei pozzetti adeguati.
4. Pipettare 50 µl di coniugato anti IFN-γ -HRP in tutti i pozzetti.
5. Incubare per 2 ore a 18-28°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 della soluzione di rivelazione in ogni pozzetto entro 15 minuti dal termine della fase di lavaggio.
9. Incubare la piastra di microtitolazione per 15 minuti a 18-28°C su un agitatore orizzontale a 700 ± 100 rpm; evitare la luce diretta del sole.
10. Pipettare 100 µl di soluzione di arresto in ogni pozzetto.
11. 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 ELISA-AID™.
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 ELISA-AID™ 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:
  - $X_i = \text{OD a } 450 \text{ nm}$
  - $Y_i = \text{OD at } 490 \text{ nm}$
  - 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 IFN-γ 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 IFN-γ, 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.

IFN- $\gamma$ -ELISA		Unità OD Modello policromatico
Calibratore	0 IU/ml	0,03
	1 IU/ml	0,173
	2 IU/ml	0,339
	5 IU/ml	0,700
	10 IU/ml	1,353
	30 IU/ml	3,107

**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 0,03 IU/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- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\beta$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF, OSM, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , LIF, MCP-1, G-CSF e RANTES. Tale test per il dosaggio dell' IFN- $\gamma$  è specifico per l' IFN- $\gamma$  naturale e ricombinante umano.

**C. Precisione**

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> $\pm$ SD (IU/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> $\pm$ SD (IU/ml)	CV (%)
A	10	1,26 $\pm$ 0,03	3,2	A	20	1,61 $\pm$ 0,03	5,8
B	10	12,28 $\pm$ 0,35	3,8	B	20	5,72 $\pm$ 0,51	8,8

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

**D. Accuratezza**

## TEST DI RECUPERO

Campione	IFN- $\gamma$ aggiunta (IU/ml)	IFN- $\gamma$ recuperata (IU/ml)	Recupero (%)
Siero	20,5	20,3	99
	9,9	10,1	103
	4,7	4,8	101
	2,4	2,3	94
	1,0	1,0	99
Plasma	20,5	19,6	96
	9,9	9,5	97
	4,7	4,8	102
	2,4	2,4	101
	1,0	1,0	96

TEST DI DILUIZIONE			
Campione	Diluizione	Conc. teorica (IU/ml)	Conc. misurata (IU/ml)
Siero	1/1	-	18,0
	1/2	9,0	8,1
	1/4	4,5	4,4
	1/8	2,3	2,4
	1/16	1,1	1,3
	1/32	0,6	0,6
Plasma	1/1	-	11,7
	1/2	5,9	5,9
	1/4	2,9	3,2
	1/8	1,5	1,6
	1/16	0,7	0,8
	1/32	0,4	0,4

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.

TEMPO TRASCORSO				
	T0	10 min	20 min	30 min
S1	2,7	2,7	2,7	2,7
S2	6,8	6,8	6,5	6,7
S3	4,2	4,1	4,0	4,0
N1	22,7	21,2	19,4	22,0
N2	24,9	23,7	21,7	20,1
N3	14,7	14,8	13,1	12,6
N4	17,9	15,3	13,8	13,9
N5	17,4	16,5	15,6	15,0

#### D. Effetto hook

Un campione ha cui è stata aggiunta IFN- $\gamma$  fino a 500 000 IU/ml ha OD superiori a quello dello standard più concentrato.

### 13. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull' 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, il valore medio di 30 campioni di siero normale è risultato pari a 0.28 IU/ml (SD = 0.15), con range 0 IU/ml - 0.77 IU/ml. Tale studio è stato condotto utilizzando campioni di soggetti apparentemente sani, con bassi valori di PCR. Il valore medio di 60 campioni di plasma normale ottenuto assumendo massime precauzioni nella raccolta, è risultato pari a 0.08 IU/ml (SD = 0.12), con range 0 IU/ml - 0.89 IU/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. GUERRY D., ALEXANDER M.A., ELDER D.E. and HERLYN M.F. (1987) **IFN- $\gamma$  regulated the T cell response to precursor nevi and biologically early melanoma.** J. Immunol., 139 : 305-312.
2. LANDOLFO S., COFANO F., GIOVARELLI M., PRAT M., CAVALLO G. and FORNI G. (1985) **Inhibition of IFN- $\gamma$  may suppress allograft reactivity by T lymphocytes in vitro and in vivo.** Sci., 119 : 176-179.
3. MURRAY H.W. (1988) **Interferon gamma, the activated macrophage and host defense against microbial challenge.** Ann. Int. Med. , 108 : 595-608.
4. NATHAN C.F., KAPLAN G., LEVIS W.R., NUSRAT A., WITMER M.D., SHERWIN S.A., JOB C.K., HOROWITZ C.R., STEINMAN R.M. and COHN Z.A. (1986) **Local and systemic effects of intradermal rIFN gamma in patients with lepromatous leprosy.** N. Engl. J. Med., 315 : 6-12.
5. SNAPPER C.M. and PAUL W.E. (1987) **IFN- $\gamma$  and BSF-1 reciprocally regulate Ig Isotope production.** Sci., 236 : 944-946.
6. SUZUKI Y., ORELLANA M.A., SCHREIBER R.D. and REMINGTON J.S. (1988) **Interferon gamma : the major mediator of resistance against Toxoplasma gondii.** Sci., 240 : 516-518

**17. SCHEMA DEL DOSAGGIO**

	<b>CALIBRATORE (<math>\mu</math>l)</b>	<b>CAMPIONI CONTROLLI (<math>\mu</math>l)</b>
Calibratore (0 - 5)	50	-
Campioni, controlli coniugato anti- IFN- $\gamma$ -HRP	- 50	50 50
Incubare per 2 ore a 18-28°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 di Rivelazione	100	100
Incubare per 30 minuti a 18-28°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	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	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	Usage 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 Cat.
	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	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	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>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore