



Instructions for Use

TNF- α ELISA

IVD



REF EIA-4641

Σ 96



DRG

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

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

1	USO DEL KIT	17
2	INFORMAZIONI CLINICHE	17
3	PRINCIPIO DEL METODO	17
4	REATTIVI FORNITI.....	18
5	REATTIVI NON FORNITI.....	18
6	PREPARAZIONE DEI REATTIVI	19
7	CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI	19
8	RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.....	19
9	METODO DEL DOSAGGIO	20
10	CALCOLO DEI RISULTATI.....	21
11	CARATTERISTICHE TIPICHE.....	21
12	CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO.....	21
13	CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO	22
14	INTERVALLI DI RIFERIMENTO.....	23
15	PRECAUZIONI PER L'USO	23
16	SCHEMA DEL DOSAGGIO	23
1	INDICACIONES	24
2	ANTECEDENTES CLÍNICOS	24
3	PRINCIPIOS DEL MÉTODO	24
4	REACTIVOS PROPORCIONADOS	25
5	SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS	25
6	PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS	26
7	CONSERVACIÓN Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS.....	26
8	RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	26
9	PROCEDIMIENTO.....	27
10	CÁLCULO DE LOS RESULTADOS	28
11	DATOS TÍPICOS.....	28
12	EFICACIA Y LIMITACIONES	28
13	CONTROL DE CALIDAD INTERNO	29
14	INTERVALOS DE REFERENCIA.....	30
15	PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS	30
16	RESUMEN DEL PROTOCOLO.....	30
17	BLIOGRAPHY / LITERATUR / RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI / BIBLIOGRAFÍA.....	31
	SYMBOLS USED.....	32

1 INTENDED USE

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

2 CLINICAL BACKGROUND

2.1 Biological activities

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

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

2.2 Clinical application

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

3 PRINCIPLES OF THE METHOD

The DRG TNF- α -ELISA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on microtiter plate. The assay uses monoclonal antibodies (MAbs) directed against distinct epitopes of TNF- α . Standards and samples react with the capture monoclonal antibody (MAb 1) coated on microtiter well and with a monoclonal antibody (MAb 2) labelled with horseradish peroxidase (HRP). After an incubation period allowing the formation of a sandwich: coated MAb 1 – human TNF- α – MAb 2 – HRP, the microtiter plate 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 microtiter plate is then read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is proportional to the TNF- α concentration.

A calibration curve is plotted and TNF- α concentration in samples is determined by interpolation from the calibration curve. The use of the 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
MICROTITERPLATE	Microtiter plate with 96 anti-TNF- α (monoclonal antibodies) coated wells	96 wells	Ready for use
Ab HRP CONC	Conjugate: HRP labelled anti-TNF- α (monoclonal antibodies) in TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin and thymol	1 vial 0.75 mL	Add conjugate buffer (see section 6)
CAL 0	Zero calibrator in human plasma, benzamidin and thymol	2 vials lyophil.	Add distilled water (see on the label for the exact volume)
CAL N	Calibrator N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in human plasma, benzamidine and thymol	5 vials lyophil.	Add 2 mL distilled water
CON BUF	Conjugate buffer: TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin, EDTA and thymol	1 vial 6 mL	Ready for use
INC BUF	Incubation buffer: TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin, EDTA and thymol	1 vial 6 mL	Ready for use
WASH SOLN CONC	Wash Solution Conc. (Tris-HCl)	1 vial 10 mL	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CONTROL N	Control - N = 1 or 2 in human plasma and thymol	2 vials lyophil.	Add 2 mL distilled water
CHROM TMB	Chromogen TMB (Tetramethylbenzidine)	1 vial 12 mL	Ready for use
STOP SOLN	Stopping solution: HCl 1.0N	1 vial 12 mL	Ready 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 μ L, 200 μ 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 microtiter plate shaker capable of 700 rpm \pm 100 rpm
6. Washer for microtiter plates
7. Microtiter plate 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 vial label with distilled water and the other calibrators with 2 mL distilled water.

B. Controls:

Reconstitute the controls with 2 mL distilled water.

C. Conjugate Solution:

following the number of wells to be used, dilute the concentrated conjugate with the conjugate buffer in a clean glass vial: see below table for the volumes to pipette. Extemporaneous preparation is recommended. Diluted conjugate is stable for max. 1 week at 2 °C - 8 °C.

TABLE CONJUGATE DILUTION

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

D. Working Wash solution:

Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 199 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (200x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

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 °C - 8°C.
- Unused strips must be stored, at 2 °C - 8 °C, in a sealed bag containing a desiccant until expiration date.
- After reconstitution, standards and controls are stable for 4 days at 2 °C - 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 °C - 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 °C - 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 °C - 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

9.1 Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date.

Do not mix materials from different kit lots.

Bring all the reagents 18 °C - 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 standard and the last sample must be limited to the time mentioned in section *Time delay*.

Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

The Chromogen TMB 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 Chromogen TMB Solution within 15 minutes following the washing of the microtiter plate.

During incubation with Revelation Solution, avoid direct sunlight on the microtiter plate.

9.2 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 °C - 8 °C.
2. Secure the strips into the holding frame.
3. Pipette 50 μ L of incubation buffer into all the wells
4. Pipette 200 μ L of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
5. Incubate for 2 hours at 18 °C - 25 °C on a horizontal shaker set at 700 rpm \pm 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 μ L of zero calibrator into all the wells
9. Pipette 50 μ L of anti- TNF- α -HRP conjugate into all the wells.
10. Incubate for 2 hours at 18 °C - 25 °C on a horizontal shaker set at 700 rpm \pm 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 μ L of Chromogen TMB into each well within 15 minutes following the washing step.
14. Incubate the microtiter plate for 15 minutes at 18 °C - 25 °C on a horizontal shaker set at 700 rpm \pm 100 rpm, avoid direct sunlight.
15. Pipette 100 μ L 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 3 hours and calculate the results as described in section 10.

10 CALCULATION OF RESULTS

10.1 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 = OD at 450 nm

Y_i = OD at 490 nm

Using a standard unweighted linear regression, the parameters A & B are calculated: $Y = A \times X + B$

If $X_i < 3$ OD units, then X calculated = X_i

If $X_i > 3$ OD units, then X calculated = $(Y_i - B) / A$

A 4 parameter logistic curve fitting is used to build up the calibration curve.

The TNF- α concentration in samples is determined by interpolation on the calibration curve.

10.2 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 standard against the corresponding concentration of TNF- α (abscissa) and draw a calibration curve through the standard 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- α -ELISA		OD units Polychromatic model
Standard	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

12.1 Detection Limit

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

12.2 Specificity

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

This TNF- α assay is specific for human natural and recombinant TNF- α .

12.3 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

12.4 Accuracy**RECOVERY TEST**

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

DILUTION TEST

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

Samples were diluted with zero standard.

12.5 Time delay between last standard and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the standards 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 vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.

If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Controls that contain azide will interfere with the enzymatic reaction and cannot be used.

Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory 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 SUMMARY OF THE PROTOCOL

	CALIBRATORS (μL)	SAMPLE(S) CONTROLS (μL)
Incubation buffer	50	50
Calibrators (0-5)	200	-
Samples, Controls	-	200
Incubate for 2 hours at 18 °C - 25 °C with continuous shaking at 700 rpm. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 μ L of Wash Solution and aspirate.		
Zero Calibrator	100	100
Anti-TNF- α -HRP conjugate	50	50
Incubate for 2 hours at 18 °C - 25 °C with continuous shaking at 700 rpm. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 μ L of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic Solution	100	100
Incubate for 15 min at 18 °C - 25 °C with continuous shaking at 700 rpm.		
Stop Solution	100	100
Read on a microtiter plate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (and 490 nm) versus 630 (or 650 nm)		

1 VERWENDUNGSZWECK

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

2 KLINISCHER HINTERGRUND

2.1 Biologische Aktivität

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

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

2.2 Klinische Anwendungen

TNF- α spielt eine große pathogene Rolle : bei der Kachexie einhergehend mit chronischen Infektionen oder karzinogenen Erkrankungen, beim septischen Schock, wobei die Neutralisation von TNF- α gegen eine drohende akute Letalität schützt, bei der Abstoßung von Transplantaten sowie der GVH-Erkrankung und bei parasitären Erkrankungen, wobei TNF- α einen gewissen Schutz bietet, aber auch schwerere Formen der Krankheit fördern kann (z.B. die zerebrale Form der Malaria). TNF- α , das oft in Kombination mit anderen Zytokinen auftritt, ist ebenso in verschiedene Autoimmunerkrankungen und sogar in der Pathogenese der Arteriosklerose involviert. Abnormal hohe Serumwerte von TNF- α wurden beim septischen Schock, bei der Abstoßung von Transplantaten, Infektionen durch Parasiten, Krebs, nach Hämofiltration und während der in vivo Therapie mit Zytokinen (IL-2) usw. beschrieben. Neben dem Verständnis 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- α -ELISA ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay (ELISA) im Mikrotiterplattenformat. Der Assay benutzt monoklonale Antikörper (MAbs), die gegen verschiedene Epitope von TNF- α gerichtet sind. Standards und Proben reagieren mit dem primären monoklonalen Antikörper (MAk 1), mit dem die Wells der Mikrotiterplatte beschichtet sind, und mit einem monoklonalen Antikörper (MAk 2), der mit Meerrettich-Peroxidase (MRP) markiert ist. Nach einer Inkubationsphase bildet sich ein Sandwich-Komplex: MAk 1 - TNF- α - MAk 2 - MRP; nicht gebundene enzymschriftete Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Gebundene enzymschriftete Antikörper werden durch eine Farbreaktion gemessen. Farblösung (TMB – H₂O₂) wird hinzugefügt und inkubiert. Die Reaktion wird durch Hinzufügen einer Stopplösung beendet und die Mikrotiterplatte wird bei adäquater Wellenlänge ausgewertet. Die Menge an Substratumsatz wird kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die proportional zur TNF- α -Konzentration ist.

Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die TNF- α -Konzentration in den Proben wird durch Interpolation von der Kalibrationskurve bestimmt. Die Verwendung des 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
MICROTITERPLATE	Mikrotiterplatte mit 96 anti TNF- α - beschichtete Wells (monoklonale Antikörper)	96 Wells	gebrauchsfertig
Ab HRP CONC	Konjugat: MRP beschriftete Anti- TNF- α (monoklonale Antikörper) in TRIS-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin und Thymol	1 Gefäß 0,75 mL	Konjugatpuffer zugeben (beachten sie Abschnitt 6)
CAL 0	Null-Kalibrator in Humanplasma mit Benzamidin und Thymol	2 Gefäße lyophilisiert	Dest. Wasser zugeben (das exakte Volumen bitte dem Etikett entnehmen)
CAL N	Kalibrator - N = 1 bis 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanplasma mit Benzamidin und Thymol	5 Gefäße lyophilisiert	2 mL dest. Wasser zugeben
CON BUF	Konjugatpuffer: TRIS-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin, EDTA und Thymol	1 Gefäß 6 mL	gebrauchsfertig
INC BUF	Inkubationspuffer: TRIS-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin, EDTA und Thymol	1 Gefäß 6 mL	gebrauchsfertig
WASH SOLN CONC	Waschlösung- (Tris-HCl)	1 Gefäß 10 mL	200 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
CONTROL N	Kontrollen - N = 1 oder 2 Humanplasma mit Thymol	2 Gefäße lyophilisiert	2 mL dest. Wasser zugeben
CHROM TMB	Chromogenes TMB (Tetramethylbenzidin)	1 Gefäß 12 mL	gebrauchsfertig
STOP SOLN	Stopplösung: HCl, 1,0 N	1 Gefäß 12 mL	gebrauchsfertig

- Bemerkung: 1. Benutzen Sie den Null-Kalibrator zur Probenverdünnung.
2. 1 pg der Standardzubereitung ist äquivalent zu 40 mIU 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 μ L, 200 μ 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 Etikett des Fläschchens angegebenen Volumen mit destilliertem Wasser und die anderen Kalibratoren mit 2 mL destilliertem Wasser.

B. Kontrollen: Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 2 mL destilliertem 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 °C - 8 °C stabil.

TABELLE KONJUGATVERDÜNNUNG

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

D. Waschlösung:

Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (200x) mit 199 Anteilen destilliertem 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 Standards 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 °C - 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 °C 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 -70 °C für maximal 1 Jahr gelagert werden.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Vor Gebrauch müssen alle Proben 18 °C - 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

9.1 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 °C - 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 *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.

9.2 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 °C bis 8 °C gelagert werden.
2. Befestigen Sie die Streifen im Halterahmen.
3. Pipettieren Sie 50 μ L Inkubationspuffer in alle Wells.
4. Pipettieren Sie jeweils 200 μ L Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Wells.
5. Inkubieren Sie 2 Stunden bei 18 °C - 25 °C auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm \pm 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 μ L Null-Kalibrator in alle Wells.
9. Pipettieren Sie 50 μ L Anti- TNF- α -MRP-Konjugat in alle Wells.
10. Inkubieren Sie 2 Stunden bei 18 °C - 25 °C auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm \pm 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 μ L der Substratlösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jeden Well.
14. Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 15 Minuten bei 18 °C - 25 °C auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm \pm 100 rpm; vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
15. Pipettieren Sie 100 μ L 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

10.1 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:
 - $X_i = \text{OD bei 450 nm}$
 - $Y_i = \text{OD bei 490 nm}$
 - Verwendung der nicht gewichtete lineare Regression, Parameter A & B werden berechnet: $Y = A \times X + B$
 - Wenn $X_i < 3$ OD Einheiten, dann X berechnet = X_i
 - Wenn $X_i > 3$ OD Einheiten, dann X berechnet = $(Y_i - B) / A$
 - Die Kalibrationskurve wird unter Verwendung einer 4 Parameter logistischen Kurve erstellt.
 - Die TNF- α -Konzentration in den Proben wird durch Interpolation auf der Kalibrationskurve bestimmt.

10.2 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 Kalibrator gegen die entsprechende Konzentration TNF- α (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- α -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

12.1 Nachweisgrenze

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

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

12.2 Spezifität

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

Dieses TNF- α Assay ist spezifisch für humanes natürliches und rekombinantes TNF- α .

12.3 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

12.4 Genauigkeit**WIEDERFINDUNGSTEST**

Probe	Zugew. TNF- α (pg/mL)	Wiedergef. TNF- α (pg/mL)	Wiederfindung (%)
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.	Theoretische. Konz. (pg/mL)	Gemessene. 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.

12.5 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 den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.

Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte. Kontrollen mit erhöhten Azidkonzentrationen stören die Enzymreaktion und können nicht verwendet werden.

Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

Es wird empfohlen, Kontrollen im Assay routinemäßig wie unbekannte Proben zu behandeln, um die Assayvarianz zu messen. Die Leistung des Assay muss mit den Qualitätskontrollkarten der Kontrollen überprüft werden.

Es hat sich bewährt, die durch den Computer ausgewählte Kurvenanpassung visuell zu überprüfen.

14 REFERENZINTERVALLE

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

Zur Orientierung:

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

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 ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	KALIBRATOREN (μ L)	PROBE(N) KONTROLLEN (μ L)
Inkubationspuffer	50	50
Kalibratoren (0-5)	200	-
Proben, Kontrollen	-	200
2 Stunden bei 18 °C - 25 °C unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren. Inhalt jedes Wells absaugen. Dreimal mit 400 μ L Waschlösung waschen und absaugen.		
Null-Kalibrator	100	100
Anti- TNF- α -MRP Konjugat	50	50
2 Stunden bei 18 °C - 25 °C unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren. Inhalt jedes Wells absaugen. Dreimal mit 400 μ L Waschlösung waschen und absaugen.		
Substratlösung	100	100
30 min. bei 18 °C - 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 immunoenzimetrico per la determinazione quantitativa in vitro del Fattore di Necrosi Tumorale α umana (TNF- α) in siero.

2 INFORMAZIONI CLINICHE

2.1 Attività biologiche

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

- *Attività antitumorali e regolatorie della crescita:* il TNF- α mostra una tossicità selettiva per cellule tumorali o infettate da virus. Per contro, ha effetto angiogenico e stimola la crescita di fibroblasti in coltura.
- *Attività immunomodulatorie e proinfiammatorie:* Il TNF- α attiva macrofagi, neutrofilii ed eosinofili, nonché le cellule endoteliali (con attività procoagulante). Regola la produzione anticorpale dei linfociti B e stimola i linfociti T citotossici. Induce la produzione di molti altri mediatori dell'infiammazione, quali IL-1, IL-6, fattori stimolanti le colonie, prostaglandine, fattore attivante le piastrine (PAF), collagenasi ecc.
- *Attività metaboliche:* Il TNF- α inibisce fortemente la lipoproteina lipasi e l'espressione genica in adipociti.

2.2 Applicazione clinica

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

3 PRINCIPIO DEL METODO

TNF- α -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- α . I calibratori e i campioni reagiscono con la cattura dell'anticorpo monoclonale (MAB 1) che riveste il pozzetto di microtitolazione e con un anticorpo monoclonale (MAB 2) marcato con horseradish perossidasi (HRP). Dopo un periodo di incubazione che consenta la formazione di un sandwich: MAB 1 di rivestimento –TNF- α umana – MAB 2 – HRP, la piastra di microtitolazione viene lavata per rimuovere l'anticorpo marcato con enzima non legato. L'anticorpo marcato con enzima non legato viene misurato attraverso una reazione cromogenica. Si procede quindi con l'aggiunta della soluzione cromogena (TMB) e successiva incubazione. La reazione viene interrotta con l'aggiunta di Soluzione di arresto; quindi la piastra di microtitolazione viene letta alla lunghezza d'onda adeguata. La quantità di turnover del substrato viene determinata colorimetricamente misurando l'assorbanza che è proporzionale alla concentrazione di TNF- α .

Viene tracciata una curva di calibrazione e la concentrazione TNF- α nei campioni viene determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione. L'utilizzo del lettore 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
MICROTITER PLATE	Piastra di microtitolazione con 96 pozzetti rivestiti anti TNF- α	96 pozzetti	Pronte per l'uso
Ab HRP CONC	Coniugato: anti- TNF- α (anticorpi monoclonali) marcato con HRP in tampone TRIS-maleato con albumina di siero bovino e timolo	1 flacone 0,75 mL	Aggiungere il tampone del coniugato (vedi paragrafo 6)
CAL 0	Calibratore Zero: plasma umano con benzamidina e timolo	2 flaconi liofiliz	Aggiungere acqua distillata (vedi etichetta per volume esatto)
CAL N	Calibratore N= 1-5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi) in plasma umano con benzamidina e timolo.	5 flaconi liofiliz.	Aggiungere 2 mL di acqua distillata
CON BUF	Tampone del coniugato: tampone TRIS-maleato con albumina di siero bovino, EDTA e timolo.	1 flacone 6 mL	Pronte per l'uso
INC BUF	Tampone di incubazione: tampone TRIS-maleato con albumina di siero bovino, EDTA e timolo	1 flacone 6 mL	Pronte per l'uso
WASH SOLN CONC	Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	1 flacone 10 mL	Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico).
CONTROL N	Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano e timolo	2 flaconi liofiliz.	Aggiungere 2 mL di acqua distillata
CHROM TMB	Soluzione Cromogena TMB (tetrametilbenzidina)	1 flacone 12 mL	Pronte per l'uso
STOP SOLN	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

1. Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.
2. Acqua distillata di qualità elevata
3. Pipette per dispensare 50 μ L, 200 μ L, 1 mL e 10 mL (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
4. Agitatore tipo vortex.
5. Agitatore magnetico.
6. Agitatore orizzontale per micropiastre da 700 \pm 100 rpm
7. Lavatrice per piastra di microtitolazione
8. 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 sull'etichetta del flacone e gli altri calibratori con 2 mL di acqua distillata.

B. Controlli:

Ricostituire i controlli con 2 mL di acqua distillata.

C. Coniugato Anti-TNF- α -HRP:

Sulla base del numero di pozzetti da utilizzare, diluire il coniugato concentrato con il tampone del coniugato in un flacone di vetro pulito: vedi la tabella qui di seguito per i volumi da pipettare. Si raccomanda la preparazione estemporanea. Il coniugato diluito mantiene la stabilità per un massimo di una settimana a 2 °C - 8 °C.

TABELLA DI DILUIZIONE DEL CONIUGATO

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

D. Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:

Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 199 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (200x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

7 CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2 °C - 8 °C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Le strisce reattive inutilizzate devono essere conservate a 2 °C - 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 °C - 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 - scongelamento dei campioni.
- La soluzione di lavaggio concentrata è stabile a 18 °C - 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 °C - 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-scongelamento dei campioni.
- Prima dell'impiego, tutti i campioni devono essere a 18 °C - 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- α da parte delle cellule ematiche con conseguente aumento falsato dei livelli sierici di TNF- α .
- Le provette di raccolta devono essere apirogene.

9 METODO DEL DOSAGGIO

9.1 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 °C - 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 12.5 (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 Cromogena 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 Cromogena entro 15 minuti dopo il lavaggio della piastra di microtitolazione.

Durante l'incubazione con la Soluzione Cromogena evitare la luce diretta del sole sulla piastra di microtitolazione.

9.2 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 °C - 8 °C.
2. Assicurare le strisce reagenti nel telaio di supporto.
3. Pipettare 50 μ L di Tampone di Incubazione in ogni pozzetto
4. Pipettare 200 μ L di ogni calibratore, controllo e campione nei pozzetti adeguati.
5. Incubare per 2 ore a 18 °C - 25 °C su agitatore orizzontale regolato a 700 \pm 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 μ L del calibratore zero in tutti i pozzetti.
9. Pipettare 50 μ L di coniugato anti- TNF- α -HRP in tutti i pozzetti.
10. Incubare per 2 ore a 18 °C - 25 °C su agitatore orizzontale regolato a 700 \pm 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 μ L della soluzione cromogena in ogni pozzetto entro 15 minuti dal termine della fase di lavaggio.
14. Incubare la piastra di microtitolazione per 15 minuti a 18 °C - 25 °C su un agitatore orizzontale a 700 \pm 100 rpm; evitare la luce diretta del sole.
15. Pipettare 100 μ L 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

10.1 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:

$$X_i = \text{OD a 450 nm}$$

$$Y_i = \text{OD at 490 nm}$$

Utilizzando una regressione lineare standard non pesata, i parametri A & B sono calcolati: $Y = A \times X + B$

Se $X_i < 3$ unità OD, X calcolato = X_i

Se $X_i > 3$ unità OD, X calcolato = $(Y_i - B) / A$

Per tracciare la curva di calibrazione viene utilizzato un modello di adattamento della curva logistica a 4 parametri.

La concentrazione di TNF- α nel campione viene determinata per interpolazione sulla curva di calibrazione.

10.2 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- α , 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- α -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

12.1 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.

12.2 Specificità

Nessuna reazione crociata significativa è stata osservata in presenza di 50 ng di IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TNF- β , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TGF- β , GM-CSF, OSM, MIP-1 α , MIP-1 β , LIF, MCP-1, G-CSF e RANTES.

Tale test per il dosaggio del TNF- α è specifico per il TNF- α naturale e ricombinante umano.

12.3 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

12.4 Accuratezza**TEST DI RECUPERO**

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

TEST DI DILUIZIONE

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (pg/mL)	Concentrazione misurata (pg/mL)
Siero 1	1	-	436.5
	2	218.3	212.4
	4	109.1	104.8
	8	54.6	59.5
	16	27.3	31.7
Siero 2	1	-	420.2
	2	210.1	211.2
	4	105.0	98
	8	52.5	58.3
	16	26.3	30.7

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

12.5 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 QUALITÀ INTERNO

Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.

Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. I controlli che contengono azide interferiscono con la reazione enzimatica e quindi non possono essere utilizzati.

I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

Si raccomanda di saggiare i controlli con regolarità come campioni sconosciuti per misurare la variabilità del saggio. La resa del saggio deve essere monitorata con tabelle di controllo qualità dei controlli.

È buona pratica verificare visivamente il modello di curva selezionato dal computer.

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 SCHEMA DEL DOSAGGIO

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

1 INDICACIONES

Ensayo enzimoinmunométrico para la determinación cuantitativa *in vitro* del Factor de Necrosis Tumoral- α humano en suero.

2 ANTECEDENTES CLÍNICOS

2.1 Actividades biológicas

El Factor de Necrosis Tumoral alfa humano (TNF- α) también conocido como caquectina, es una citocina polipeptídica no glicosilada de 157 aa producida principalmente por macrófagos activados (monocitos). Los lipopolisacáridos (LPS), los componentes de la pared celular de las bacterias gramnegativas (endotoxina), son un potente estímulo para la producción de TNF- α por macrófagos y el TNF- α es un importante mediador de los efectos *in vivo* bien conocidos de los LPS, como la necrosis hemorrágica tumoral, fiebre, choque séptico y activación de neutrófilos. Las diversas actividades biológicas del TNF- α pueden clasificarse como:

- *Actividades antitumorales y reguladoras del crecimiento:* El TNF- α muestra una toxicidad selectiva para tumores y células infectadas con virus. A la inversa, es angiogénico y estimula el crecimiento de fibroblastos cultivados.
- *Actividades inmunomoduladoras y proinflamatorias:* El TNF- α activa los macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, así como las células endoteliales (que muestran actividad procoagulante). Regula la producción de anticuerpos mediante los linfocitos B y estimula los linfocitos T citotóxicos. Induce la producción de muchos otros mediadores inflamatorios, como IL-1, IL-6, factores estimulantes de colonias, prostaglandinas, factor activador de plaquetas (PAF), colagenasas, etc.
- *Actividades metabólicas:* El TNF- α inhibe fuertemente la lipoproteínlipasa y la expresión génica de los adipocitos.

2.2 Aplicación clínica

El TNF- α tiene una importante función patógena: en la caquexia asociada con enfermedades crónicas infecciosas o cancerosas; en el choque séptico donde la neutralización de TNF- α protege contra la letalidad aguda asociada; en el rechazo de injertos y la enfermedad de injerto contra huésped; y en infecciones parasitarias en las que el TNF- α puede brindar cierta protección, pero también favorece formas más graves de la enfermedad (por ejemplo, la forma cerebral de la malaria). El TNF- α a menudo en combinación con otras citocinas, también ha estado involucrado en varias enfermedades autoinmunes e incluso en la patogénesis de la arteriosclerosis. Se han descrito niveles altos anómalos de TNF- α en suero en el choque séptico, rechazo del injerto, infecciones parasitarias, cáncer, después de hemofiltraciones, durante la terapia de citocinas *in vivo* (IL-2), etc. Además de una mejor comprensión de la patogénesis, estas determinaciones podrían proporcionar una ayuda en el diagnóstico (p. ej., en el rechazo de injertos) y tiene valor pronóstico (p. ej., en infecciones sistémicas).

3 PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El TNF- α -ELISA de DRG es un inmunoensayo enzimático de sensibilidad amplificada en fase sólida que se realiza en placa de microvaloración. El ensayo utiliza anticuerpos monoclonales (AcM) dirigidos contra distintos epítomos del TNF- α . Los calibradores y las muestras reaccionan con el anticuerpo monoclonal de captura (AcM 1) que recubre el pocillo de microvaloración y con un anticuerpo monoclonal (AcM 2) marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Tras un período de incubación que permite la formación de un sándwich: AcM 1 recubierto – TNF- α humana – AcM 2 – HRP, se lava la placa de microvaloración para eliminar el anticuerpo marcado con enzimas no unidas. El anticuerpo marcado con enzimas unidas se mide a través de una reacción cromogénica. Se añade la solución cromogénica (TMB) y se incuba. Se detiene la reacción añadiendo solución de parada y a continuación se lee la placa de microvaloración a la longitud de onda adecuada. La cantidad de sustrato transformado se determina colorimétricamente midiendo la absorbancia, que es proporcional a la concentración de TNF- α .

Se representa una curva de calibración y se determina la concentración de TNF- α de las muestras mediante interpolación en la curva de calibración. El uso del lector ELISA (linealidad de hasta 3 unidades de DO) y de un método sofisticado de reducción de datos (reducción de datos policromáticos) da lugar a una sensibilidad alta en el intervalo bajo y a un intervalo de calibración extendido.

4 REACTIVOS PROPORCIONADOS

	Reactivos	Kit de 96 pruebas	Reconstitución
MICROTITERPLATE	Placa de microvaloración de 96 pocillos recubiertos con anti- TNF- α (anticuerpos monoclonales)	96 pocillos	Listo para usar
Ab HRP CONC	Conjugado: HRP marcado anti TNF- α (anticuerpos monoclonales) en tampón de maleato-TRIS con albúmina de suero bovino y timol	1 vial 0,75 mL	Añadir tampón de conjugado (consultar la sección 6)
CAL 0	Calibrador cero en plasma humano, benzamidina y timol	2 viales liofil.	Añadir agua destilada (véase en la etiqueta el volumen exacto)
CAL N	Calibrador N = 1 a 5 (véanse los valores exactos en las etiquetas del vial) en suero humano, benzamidina y timol	5 viales liofil.	Añadir 2 mL de agua destilada
CON BUF	Tampón del conjugado: Tampón de maleato-TRIS con albúmina de suero bovino, EDTA y timol	1 vial 6 mL	Listo para usar
INC BUF	Tampón de incubación: Tampón de maleato-TRIS con albúmina de suero bovino, EDTA y timol	1 vial 6 mL	Listo para usar
WASH SOLN CONC	Solución de lavado (Tris-HCl)	1 vial 10 mL	Diluir 200 x con agua destilada (usar un agitador magnético).
CONTROL N	Controles - N = 1 o 2 en plasma humano y timol	2 viales liofil.	Añadir 2 mL de agua destilada
CHROM TMB	TMB cromogénica (tetrametilbencidina)	1 vial 12 mL	Listo para usar
STOP SOLN	Solución de parada: HCl 1,0N	1 vial 12 mL	Listo para usar

- Nota:**
1. Para diluciones de muestras utilizar el calibrador cero.
 2. 1 pg de la preparación del calibrador es equivalente a 40 mIU del estándar internacional 87/650 del NIBSC.

5 SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

El material siguiente es necesario pero no se proporciona en el kit:

1. Agua destilada de alta calidad
2. Pipetas para dispensación de: 50 μ L, 200 μ L, 1 mL y 10 mL (se recomienda usar pipetas de precisión con puntas de plástico desechables)
3. Agitador tipo vórtex
4. Agitador magnético
5. Agitador de placas de microvaloración con capacidad de 700 rpm \pm 100 rpm
6. Lavador de placas de microvaloración
7. Lector de placas de microvaloración con capacidad para leer a 450, 490 y 650 nm (en el caso de lectura policromática) o con capacidad para 450 y 650 nm (lectura bicromática)

6 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

A. Calibradores:

Reconstituya el calibrador cero al volumen especificado en la etiqueta del vial con agua destilada y los otros calibradores con 2 mL de agua destilada.

B. Controles:

reconstituya los controles con 2 mL de agua destilada.

C. Solución de conjugado:

después de la cantidad de pocillos a utilizar, diluya el conjugado concentrado con el tampón de conjugado en un vial de vidrio limpio: consulte la tabla que aparece a continuación para ver los volúmenes a pipetear. Se recomienda preparar en el momento de usar. El conjugado diluido es estable durante un máx. de 1 semana en 2 °C - 8 °C.

TABLA DE LA DILUCIÓN DEL CONJUGADO

Número de pocillos	Conjugado concentrado	Tampón del conjugado	Volumen de trabajo
8	50 μ L	500 μ L	550 μ L
16	100 μ L	1000 μ L	1100 μ L
24	150 μ L	1500 μ L	1650 μ L
32	200 μ L	2000 μ L	2200 μ L
48	300 μ L	3000 μ L	3300 μ L
96	600 μ L	6000 μ L	6600 μ L

D. Solución de lavado de trabajo:

prepare un volumen adecuado de solución de lavado de trabajo añadiendo 199 volúmenes de agua destilada a 1 volumen de solución de lavado (200 x). Use un agitador magnético para homogeneizar. Deseche la solución de lavado de trabajo no utilizada al final de la jornada.

7 CONSERVACIÓN Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir o de la reconstitución, todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad, indicada en la etiqueta del vial, si se conservan entre 2 °C - 8 °C.
- Las tiras sin usar deben conservarse entre 2 °C - 8 °C en una bolsa sellada que contenga desecante hasta la fecha de caducidad.
- Tras la reconstitución, los calibradores y los controles se mantienen estables durante 4 días a 2 °C - 8 °C. Para periodos de tiempo más largos, deben tomarse partes alícuotas y conservarse a -20 °C durante un máximo de 2 meses. Evite ciclos posteriores de congelación y descongelación.
- La solución de lavado concentrada es estable a 18 °C - 25 °C hasta la fecha de caducidad.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada deberá utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el conjugado se mantiene estable hasta la fecha de caducidad si se conserva en el vial original bien cerrado entre 2 °C - 8 °C.
- Las alteraciones del aspecto físico de los reactivos del kit pueden indicar inestabilidad o deterioro.

8 RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- El suero debe eliminarse lo antes posible del coágulo de hematíes tras la coagulación y centrifugación, y conservarse a 4 °C. Si las muestras no se utilizan inmediatamente, deben conservarse a -20 °C durante un máximo de 2 meses, y a -70 °C para periodos más largos (máximo un año).
- Evite ciclos posteriores de congelación y descongelación.
- Antes de su uso, todas las muestras deben estar a 18 °C - 25 °C. Se recomienda agitar las muestras en un vórtex antes de su uso.
- Las condiciones de obtención de las muestras pueden influir en los valores; por tanto, deben tomarse estrictas precauciones durante su recogida para evitar impurezas contenidas en los materiales de obtención de las muestras que estimulen la producción de TNF- α por las células sanguíneas y aumentar así incorrectamente los valores de TNF- α en suero.
- Los tubos de recogida deben ser apirógenos.

9 PROCEDIMIENTO

9.1 Notas sobre la manipulación

No utilice el kit o sus componentes pasada la fecha de caducidad.

No mezcle materiales de distintos lotes de kit.

Todos los reactivos deben estar a 18 °C - 25 °C antes de usarse.

Mezcle bien todos los reactivos y muestras agitándolos o revolviéndolos suavemente.

Realice los calibradores, los controles y las muestras por duplicado. Se recomienda alinear verticalmente.

Utilice un recipiente de plástico limpio para preparar la solución de lavado.

Para evitar la contaminación cruzada, utilice una punta de pipeta desechable al añadir cada reactivo y muestra.

No utilice pipetas con partes metálicas para dispensar la solución de revelación y la solución de parada.

Las pipetas de alta precisión o un equipo de pipeteo automatizado mejorarán la precisión.

Respete los tiempos de incubación.

Para que no haya desvíos, el tiempo entre el pipeteo del primer calibrador y la última muestra debe limitarse al tiempo indicado en párrafo 12.5 (Tiempo de demora).

Prepare una curva de calibración para cada análisis, no utilice datos de análisis anteriores.

La solución de revelación debe ser incolora. Si unos minutos después de la preparación se vuelve azul, indica que el reactivo no se puede usar y se debe desechar.

Dispense la solución de revelación antes de transcurridos 15 minutos desde el lavado de la placa de microvaloración.

Durante la incubación con solución de revelación, evite la luz solar directa en la placa de microvaloración.

9.2 Procedimiento

1. Seleccione el número necesario de tiras para el análisis. Las tiras no utilizadas deberían volverse a guardar herméticamente en la bolsa con un desecante y conservarse entre 2 °C - 8 °C.
2. Fije las tiras en el marco de soporte.
3. Pipetee 50 μ L de tampón de incubación en todos los pocillos
4. Pipetee 200 μ L de cada calibrador, control y muestra en los pocillos adecuados.
5. Incube durante 2 horas a 18 °C - 25 °C en un agitador horizontal configurado a 700 \pm 100 rpm.
6. Aspire el líquido de cada pocillo.
7. Lave la placa 3 veces:
Dispensando 0,4 mL de solución de lavado en cada pocillo
Aspirando el contenido de cada pocillo
8. Pipetee 100 μ L de calibrador cero en todos los pocillos
9. Pipetee 50 μ L del conjugado anti-TNF- α -HRP en todos los pocillos.
10. Incube durante 2 horas a 18 °C - 25 °C en un agitador horizontal configurado a 700 \pm 100 rpm.
11. Aspire el líquido de cada pocillo.
12. Lave la placa 3 veces:
Dispensando 0,4 mL de solución de lavado en cada pocillo
Aspirando el contenido de cada pocillo
13. Pipetee 100 μ L de la solución de revelación en cada pocillo en los 15 minutos siguientes al paso de lavado.
14. Incube la placa de microvaloración durante 15 minutos a 18 °C - 25 °C en un agitador horizontal configurado a 700 \pm 100 rpm y evite la luz solar directa.
15. Pipetee 100 μ L de solución de parada en cada pocillo.
16. Lea las absorbancias a 450 y 490 nm (filtro de referencia a 630 o 650 nm) antes de 30 minutos y calcule los resultados conforme se describe en el apartado 10.

10 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

10.1 Lectura policromática

1. En este caso, el software realizará el procesamiento de los datos.
2. La placa se lee primero a 450 nm con respecto a un filtro de referencia configurado a 650 nm (o 630 nm).
3. Se realiza una segunda lectura a 490 nm con respecto al mismo filtro de referencia.
4. El software controlará el lector automáticamente e integrará ambas lecturas en un modelo policromático. Esta técnica puede generar densidades ópticas (DO) de hasta 10.
5. El principio del procesamiento de datos policromáticos es el siguiente:
 - $X_i = \text{DO a 450 nm}$
 - $Y_i = \text{DO a 490 nm}$
 - Utilizando una regresión lineal no ponderada estándar, se calculan los parámetros A y B: $Y = A \times X + B$
 - Si $X_i < 3$ unidades de DO, entonces la X calculada = X_i
 - Si $X_i > 3$ unidades de DO, entonces la X calculada = $(Y_i - B)/A$
 - Se emplea un ajuste de la curva logística de 4 parámetros para generar la curva de calibración.
 - La concentración de TNF- α de las muestras se determina mediante interpolación en la curva de calibración.

10.2 Lectura bicromática

1. Lea la placa a 450 nm con respecto a un filtro de referencia configurado a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcule la media de las determinaciones por duplicado.
3. Represente en papel milimetrado o semilogarítmico los valores de DO (en las ordenadas) de cada calibrador en función de la concentración correspondiente de TNF- α (abscisas) y trace una curva de calibración por los puntos de los calibradores conectando los puntos con líneas rectas.
4. Lea la concentración de cada control y muestra mediante interpolación en la curva de calibración.
5. La reducción de datos con programas informáticos simplificará estos cálculos. Si se emplea un procesamiento automático de los resultados, se recomienda un ajuste de la curva mediante función logística de 4 parámetros.

11 DATOS TÍPICOS

Los datos siguientes son solo a efectos ilustrativos y no deben utilizarse nunca en lugar de la curva de calibración generada en tiempo real.

TNF- α -ELISA		Modelo policromático de unidades de DO
Calibrador	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 EFICACIA Y LIMITACIONES

12.1 Límite de detección

Se analizaron veinte calibradores cero junto con un conjunto de otros calibradores. El límite de detección, definido como la concentración aparente dos desviaciones estándar por encima del promedio de DO en la unión cero, fue de 0,7 pg/mL.

12.2 Especificidad

No se observó ninguna reacción cruzada significativa en presencia de 50 ng de IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TNF- β , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TGF- β , GM-CSF, OSM, MIP-1 α , MIP-1 β , LIF, MCP-1, G-CSF y RANTES.

Este ensayo de TNF- α es específico para TNF- α humano natural y recombinante.

12.3 Precisión

INTRAENSAYO				INTERENSAYO			
Suero	N	<X> \pm DE (pg/mL)	CV (%)	Suero	N	<X> \pm DE (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

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

12.4 Exactitud**PRUEBA DE RECUPERACIÓN**

Muestra	TNF- α añadido (pg/mL)	TNF- α recuperado (pg/mL)	Recuperación (%)
Suero 1	0	6,2	-
	38,4	43,3	97
	83,9	90,0	100
	188,3	192,5	99
	408,2	376,2	91
Suero 2	0	3,8	-
	38,4	45,5	108
	83,9	91,2	104
	188,3	162,2	84
	408,2	379,2	92

PRUEBA DE DILUCIÓN

Muestra	Dilución	Concent. teórica (pg/mL)	Concent. medida (pg/mL)
Suero 1	1	-	436,5
	2	218,3	212,4
	4	109,1	104,8
	8	54,6	59,5
	16	27,3	31,7
Suero 2	1	-	420,2
	2	210,1	211,2
	4	105,0	98
	8	52,5	58,3
	16	26,3	30,7

Las muestras se diluyeron con el calibrador cero.

12.5 Tiempo de demora entre el último calibrador y la dispensación de la muestra

Como se muestra a continuación, los resultados del ensayo siguen siendo precisos incluso cuando se dispensa una muestra 30 minutos después de haber añadido los calibradores a los pocillos recubiertos.

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

13 CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Si los resultados obtenidos para el control 1 o el control 2 no se encuentran dentro del intervalo especificado en la etiqueta del vial, no se pueden utilizar dichos resultados, salvo que se proporcione una explicación satisfactoria sobre la discrepancia.

Cada laboratorio puede, si lo desea, realizar sus propias mezclas de muestras control, que deberían conservarse congeladas en alícuotas. Los controles que contienen azida interferirán con la reacción enzimática por lo que no se pueden utilizar.

Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados duplicados de las muestras deben basarse en las Buenas Prácticas de Laboratorio.

Se recomienda analizar los controles de forma rutinaria como muestras desconocidas para medir la variabilidad del ensayo. La eficacia del ensayo debe monitorizarse con gráficas de control de calidad de los controles.

Es una buena práctica comprobar visualmente el ajuste de la curva seleccionada por el ordenador.

14 INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores se proporcionan solo como guía; cada laboratorio debería establecer su propio intervalo de valores normales.

Como guía, los resultados de 30 muestras séricas de personas aparentemente sanas con bajos niveles de PCR, se encontraron entre 4,6 y 12,4 pg/mL.

15 PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Solo para uso diagnóstico *in vitro*.

Los componentes de la sangre humana incluidos en este kit se han analizado mediante métodos europeos aprobados y/o métodos aprobados por la FDA, siendo negativos para HBsAg, anti-VHC y anti-VIH-1 y 2. Ningún método conocido puede ofrecer una garantía total de que los hemoderivados humanos no transmitan hepatitis, SIDA u otras infecciones. Por tanto, la manipulación de reactivos y las muestras de suero o plasma debe realizarse de conformidad con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos y derivados de animales se han obtenido de animales sanos. Los componentes bovinos son originarios de países en los que no se ha notificado EEB. Sin embargo, los componentes que contengan sustancias animales deben tratarse como potencialmente infecciosos.

Evite el contacto con la piel de los reactivos; la solución de parada contiene HCl. En caso de contacto, lávese bien con agua.

No fume, beba, coma ni use cosméticos en la zona de trabajo. No pipetee con la boca. Lleve ropa protectora y guantes desechables.

16 RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CALIBRADORES (μL)	MUESTRA(S) CONTROLES (μL)
Tampón de incubación	50	50
Calibradores (0-5)	200	-
Muestras, controles	-	200
Incube durante 2 horas a 18 °C - 25 °C con agitación continua a 700 rpm. Aspire el contenido de cada pocillo. Lave 3 veces con 400 μ L de solución de lavado y aspire.		
Calibrador cero	100	100
Conjugado anti-TNF- α -HRP	50	50
Incube durante 2 horas a 18 °C - 25 °C con agitación continua a 700 rpm. Aspire el contenido de cada pocillo. Lave 3 veces con 400 μ L de solución de lavado y aspire.		
Solución cromogénica	100	100
Incube durante 15 minutos a 18 °C - 25 °C con agitación continua a 700 rpm.		
Solución de parada	100	100
Lea en un lector de placas de microvaloración y registre la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (490 nm) frente a 630 (o 650 nm).		

17 BLIOGRAPHY / LITERATUR / RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI / BIBLIOGRAFÍA

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- α (TNF α) and Soluble TNF Receptors in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection - Correlations to Clinical Immunologic, and Virologic Parameters.**
J. Inf. Dis., 169:420-424.
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.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Chargencode *	Codice del lotto	Codigo de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité