



TNF- α - EASIA

KAP1751



Read entire protocol before use.

TNF- α -EASIA

I. INTENDED USE

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

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource TNF- α -EASIA Kit
- B. **Catalogue number :** KAP1751 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological activities

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

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

B. Clinical application

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

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

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

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

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 tests Kit	Color Code	Reconstitution
 Microtiterplate with 96 anti TNF-α (monoclonal antibodies) coated wells	96 wells	blue	Ready for use
Ab HRP Conjugate: HRP labelled anti-TNF-α (monoclonal antibodies) in TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin and thymol	1 vial 0.75 ml	red	Add conjugate buffer (see section VII)
CAL 0 Zero calibrator in human serum, benzamidin and thymol	2 vials lyophil.	yellow	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 serum, benzamidin and thymol	5 vials lyophil.	yellow	Add 2 ml distilled water
CONJ BUF Conjugate buffer: TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin, EDTA and thymol	1 vial 6 ml	red	Ready for use
INC BUF Incubation buffer: TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin, EDTA and thymol	1 vial 6 ml	black	Ready for use
WASH SOLN CONC Wash Solution (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	brown	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CONTROL N Controls - N = 1 or 2 in human serum and thymol	2 vials lyophil.	silver	Add 2 ml distilled water
CHROM TMB CONC Chromogen TMB (Tetramethylbenzidine) in Dimethylformamide	1 vial 1 ml	green	Dilute 0.2 ml into 1 vial of substrate buffer
SUB BUF Substrate buffer: H₂O₂ in acetate / citrate buffer	3 vials 21 ml	white	Ready for use
STOP SOLN Stopping solution: H₂SO₄ 1.8N	1 vial 6 ml	black	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.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

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

VII. REAGENT PREPARATION

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

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

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

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

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

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

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

X. PROCEDURE

A. Handling notes

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

B. Procedure

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 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 room temperature 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 room temperature 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 200 μ l of the freshly prepared revelation solution into each well within 15 minutes following the washing step.
14. Incubate the microtiterplate for 30 minutes at room temperature on a horizontal shaker set at 700 rpm $\pm$ 100 rpm, avoid direct sunlight.
15. Pipette 50 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 3 hours and calculate the results as described in section XI.

XI. 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:
 - Xi = OD at 450 nm
 - Yi = OD at 490 nm
 - Using a standard unweighted linear regression, the parameters A & B are calculated : Y = A*X + B
 - If Xi < 3 OD units, then X calculated = Xi

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

B. Bichromatic Reading

1. Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
2. Calculate the mean of duplicate determinations.
3. On semi-logarithmic or linear graph paper plot the OD values (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of TNF- α (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.

XII. TYPICAL DATA

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

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

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection Limit

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

B. Specificity

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

C. Precision

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

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST

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

DILUTION TEST

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

Samples were diluted with zero calibrator.

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

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

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

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

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

XV. REFERENCE INTERVALS

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

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

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

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

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

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

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

XVII. BIBLIOGRAPHY

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.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

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

DIASource Catalogue Nr : KAP1751	P.I. Number : 1700571/en	Revision nr : 110221/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

TNF- α -EASIA

I. BUT DU DOSAGE

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

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource TNF- α -EASIA kit
- B. **Numéro de catalogue :** KAP1751 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. Activités biologiques

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

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

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

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

B. Applications cliniques

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

IV. PRINCIPES DU DOSAGE

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

V. REACTIFS FOURNIS

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

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

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

VI. MATERIELS NON FOURNIS

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

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

VII. PREPARATION DES REACTIFS

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

TABLEAU DE DILUTION DU CONJUGUE

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

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

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

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

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

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

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

X. *MODE OPERATOIRE*

A. *Notes de manipulation*

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration.

Ne pas mélanger du matériel provenant de trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation.

Mélangez tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce.

Réaliser les calibrateurs, les contrôles et les échantillons en double. Un alignement vertical est recommandé.

Utiliser un récipient en plastic propre pour préparer la Solution de Lavage.

Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon.

Pour la distribution de la Solution de Révélation et de la Solution d'arrêt, éviter des pipettes avec des parties en métal.

Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision.

Respecter les temps d'incubation.

Afin d'éviter des anomalies, le délai entre le pipetage du premier calibrateur et celui du dernier échantillon doit être limité au délai indiqué à la section XIII paragraphe E (Délai).

Préparer une courbe d'étalonnage pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

Distribuer la Solution de Révélation dans les 15 minutes après le lavage de la microplaque de titration.

Eviter exposition à la lumière du soleil lors de l'incubation avec la Solution de Révélation.

B. *Mode opératoire*

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

XI. *CALCUL DES RESULTATS*

A. *Lecture polychromatique:*

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

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

B. *Lecture bichromatique*

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

XII. *DONNEES TYPES*

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

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

XIII. *PERFORMANCE ET LIMITES*

A. *Sensibilité*

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne DO déterminée à la fixation zéro, était de 0,7 pg/ml.

B. *Spécificité*

On n'a pas constaté de réaction croisée significative en présence de 50 ng IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TNF- β , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TGF- β , GM-CSF, OSM , MIP-1 α , MIP-1 β , LIF, MCP-1, G-CSF et RANTES. Ce dosage de l'TNF- α est spécifique de l'TNF- α humaine naturelle et recombinante.

C. *Précision*

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

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. *Exactitude*

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

TEST DE DILUTION

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

Les échantillons ont été dilués avec le calibrateur zéro.

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

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

DELAI

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

XIV. CONTROLE DE QUALITE INTERNE

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

XV. VALEURS ATTENDUES

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

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

XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

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

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

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

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

XVII. BIBLIOGRAPHIE

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

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

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

DIAsource Catalogue Nr : KAP1751	P.I. Number : 1700571/fr	Revision nr : 110221/3
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Date de révision : 2015-07-06

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

TNF- α -EASIA

I. VERWENDUNGSZWECK

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

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource TNF- α -EASIA Kit
- B. **Katalognummer :** KAP1751 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

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

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Biologische Aktivität

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

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

B. Klinische Anwendungen

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

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

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

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

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

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

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

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

TABELLE KONJUGATVERDÜNNUNG

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

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

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

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

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

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

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

X. DURCHFÜHRUNG

A. Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum.
 Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur. Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.
 Führen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben doppelt aus. Vertikale Ausrichtung wird empfohlen.
 Verwenden Sie zur Zubereitung der Waschlösung reinen Kunststoffbehälter.
 Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
 Verwenden Sie zur Pipettierung der Substratlösung und der Stopplösung keine Pipetten mit Metallteilen.
 Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.
 Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.
 Zur Vermeidung von Drift muss die Zeit zwischen dem Pipettieren des ersten Kalibrators und der letzten Probe auf die Zeit beschränkt werden, die in Abschnitt XIII Absatz E (Zeitverzögerung) erwähnt wird.
 Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.
 Pipettieren Sie die Substratlösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte.
 Während der Inkubation mit der Substratlösung ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

B. Durchführung

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

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

A. Polychromatische Auswertung:

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

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

B. Bichromatische Auswertung:

1. Werten Sie die Platte bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) aus.
2. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
3. Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration TNF- 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.

XII. TYPISCHE WERTE

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

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

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen.
 Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswert bei Nullbindung, entsprach 0,7 pg/ml.

B. Spezifität

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

C. Präzision

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

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

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

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

VERDÜNNUNGSTEST

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

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

- E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe**
Es wird im Folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann gewährleistet ist, wenn die Probe 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugegeben wird.

ZEITDIFFERENCE

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

XIV INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

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

XV. REFERENZINTERVALLE

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.
Zur Orientierung: Die Ergebnisse von 30 Serumproben augenscheinlich gesunder Personen mit niedrigen CRP Werten, liegen innerhalb der Bandbreite von 4,6 und 12,4 pg/ml.

XIII. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

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

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

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

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

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

XVII. LITERATUR

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

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

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

DIAsource Katalognummer : KAP1751	Beipackzettelnnummer: 1700571/de	Nummer der Originalausgabe: 110221/1
--------------------------------------	-------------------------------------	--

Revisionsdatum : 2011-02-21

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

TNF- α -EASIA

I. USO DEL KIT

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

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIASource TNF- α EASIA Kit
- B. Numero di catalogo:** KAP1751 : 96 tests
- C. Prodotto da:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche

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

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

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

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

B. Applicazione clinica

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

IV. PRINCIPIO DEL METODO

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

V. REATTIVI FORNITI

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

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

VI. REATTIVI NON FORNITI

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

- Acqua distillata di qualità elevata
- 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).
- Agitatore tipo vortex.
- Agitatore magnetico.
- Agitatore orizzontale per micropiastre da 700 $\pm$ 100 rpm
- lavatrice per piastra di microtitolazione
- 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).
- Strumentazione aggiuntiva: l' ELISA-AID™ necessario per la lettura policromatica delle piastre (vedi paragrafo XI.A) è acquistabile presso Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

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

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

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

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

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

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- A coagulazione e centrifugazione avvenute, il siero dovrà essere rimosso al più presto dal coagulo di eritrociti e conservato a 4°C. In caso di utilizzo non immediato, dovranno essere conservati a -20°C per 2 mesi al massimo e a -70°C per un tempo maggiore (massimo un anno).
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento dei campioni.

- Prima dell'impiego, tutti i campioni devono essere a temperatura ambiente. Si raccomanda di vortexare i campioni prima di utilizzarli.
- Le condizioni di raccolta possono influenzare i valori. Adottare pertanto le massime precauzioni durante la raccolta per evitare che eventuali impurità contenute nei campioni possano stimolare la produzione di TNF- α da parte delle cellule ematiche con conseguente aumento falsato dei livelli sierici di TNF- α .
- Le provette di raccolta devono essere apirogene.

X. METODO DEL DOSAGGIO

A. Avvertenze generali

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

B. Metodo del dosaggio

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

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

A. Lettura policromatica:

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

- * Xi = OD a 450 nm
- * Yi = OD at 490 nm
- * Utilizzando una regressione lineare standard non pesata, i parametri A & B sono calcolati: Y = A*X + B
- * Se Xi <3 unità OD, X calcolato = Xi
- * Se Xi >3 unità OD, X calcolato = (Yi-B)/A
- * Per tracciare la curva di calibrazione viene utilizzato un modello di adattamento della curva logistica a 4 parametri.
- * La concentrazione di TNF- α nel campione viene determinata per interpolazione sulla curva di calibrazione.

B. Lettura bicromatica

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

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

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

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

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

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

B. Specificità

Nessuna reazione crociata significativa è stata osservata in presenza di 50 ng di IL-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.

C. Precisione

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

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

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

TEST DI DILUIZIONE

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

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

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

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

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

XIV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

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

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

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

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

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

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

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

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

In caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua.

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

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

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

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

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

Numero di catalogo di DIASource: KAP1751	P.I. numero: 1700571/it	Revisione numero: 110221/3
--	----------------------------	-------------------------------



el

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

TNF- α -EASIA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

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

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. Εμπορική ονομασία: Κιτ TNF- α -EASIA της DIAsource
- B. Αριθμός καταλόγου: KAP1751: 96 προσδιορισμοί
- Γ. Κατασκευάζεται από την: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Φαξ: +32 (0)10 84.99.91

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Βιολογική δράση

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

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

B. Κλινικές εφαρμογές

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

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

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

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

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

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

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

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

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

ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΡΑΙΩΣΗΣ ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΟΣ

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

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

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

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

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

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

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

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό

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

B. Διαδικασία

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

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

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

A. Πολυχρωματική ανάγνωση:

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

B. Διχρωματική ανάγνωση

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

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

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

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

XIII. ΑΠΟΛΟΞΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

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

B. Ειδικότητα

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

Γ. Ακρίβεια

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

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

Δ. Ορθότητα

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

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

Τα δείγματα αραιώθηκαν με μηδενικό βαθμονομητή.

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

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

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

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

XV. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές αυτές παρέχονται μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.
Τα παρακάτω αποτελέσματα παρέχονται μόνο ως οδηγός: τα αποτελέσματα 30 δειγμάτων ορού από εμφανώς υγιή άτομα με χαμηλά επίπεδα CRP, κυμάνθηκαν μεταξύ 4,6 και 12,4 pg/ml.

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφαλείας

Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

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

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

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

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

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

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

Αρ. καταλόγου DIASource: KAP1751	Αριθμός P.I.: 1700571/el	Αρ. αναθεώρησης: 110221/1
-------------------------------------	-----------------------------	------------------------------

Olvassa el a teljes protokollt használat előtt!

TNF- α -EASIA

I. FELHASZNÁLÁSI JAVASLAT

Humán Tumor Nekrózis Faktor alfa (TNF- α) in vitro mennyiségi meghatározása Immun-enzimatis mődszerrel humán szérumból.

II. ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓ

- A. Védett név: DIAsource TNF- α -EASIA Kit
- B. Katalógusszám: KAP1751: 96 teszt
- C. Gyártó : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Technikai segítséget vagy rendeléssel kapcsolatos információt a következő elérhetőségeken kaphat.

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. KLINIKAI HÁTTÉR

A. Biológiai szerepe

Humán Tumor Nekrózis Faktor alfa (TNF- α) másnéven kahektin, 157 aminosavból épül fel, és ezt a nem glikozilált polipeptid citokint az aktivált makrofágok (monociták) állítják elő. Lipopoliszacharid (LPS), mely főleg Gram-negatív baktériumok sejtfalában található (endotoxin), potenciális stimulusa a makrofágok által termelt TNF- α -nak, továbbá a TNF- α fontos mediátora a jól ismert LPS in vivo hatásnak, mint például tumor vérzéses nekrózis, láz, sokk és neutrofil aktiválódás. A TNF- α különféle biológiai hatásait a következők szerint lehet osztályozni:

- *Tumor ellenes és növekedés szabályozó tevékenységek:* TNF- α szelektív toxicitást mutat tumor és vírus fertőzött sejtekkel szemben. Ennek megfelelően ez egy angiogén, mely serkenti a tenyésztett fibroblasztok növekedését.
- *Immunmoduláló és gyulladásokeltő hatások:* TNF- α aktiválja a makrofágokat, neutrofileket és az eozinofileket, valamint endotél sejteket (melyek prokoaguláns aktivitást mutatnak). Szabályozza a B sejtek által termelt ellenanyag termelését és a stimulálja a citotoxikus T sejteket. Indukál számos más gyulladásokeltő mediátort, mint például IL-1, IL-6, kolónia stimuláló faktorokat, proszttaglandinokat, vérlemezke-aktiváló faktort (PAF), kollagéneket, stb.
- *Metabolikus hatás:* TNF- α erősen gátolja a lipoprotein lipázt és zsírsejt génexpressziót.

B. Klinikai alkalmazás

TNF- α -nak jelentős patogén szerepe van: a cachexiában, mely krónikus fertőzésekhez és daganatos betegségekhez társul; a septicus sokkban, ahol a TNF- α semlegesítése véd a társult akut letalitástól; a graft kilökődésben és a graft-versus-host betegségben; és a parazitás fertőzéseknel, ahol TNF- α nyújthat némi védelmet, de előidézhethet egyéb súlyosabb betegségeket is (pl. malária agyi formája). TNF- α gyakran kombinálódik más citokinekkal, részt vesz számos autoimmun betegségben és még az érlemeszesedés patogenézisében is. Abnormálisan magas a szérum TNF- α szint jellemzi a septicus sokkot, graft kilökődést, parazitafertőzést, rákot, post hemofiltrációt, in vivo citokin (IL-2) terápia alatt, stb. Miután betekintettünk a patogenézisbe láthatjuk, hogy ezen meghatározás segítséget nyújthat a diagnosztizálásban (pl. graft kilökődés) és prognosztikai értéke van (pl. szisztémás fertőzéseknel).

IV. A VIZSGÁLAT ELVE

A DÍAsource TNF- α –EASIA (Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay) szilárd fázisra amplifikált enzim érzékeny immunmódszer mikrotiter lemezen. A módszer monoklonális antitesteket (MAbs) használ TNF- α különböző epitópjai ellen. Kalibrátorok és minták reakcióba lépnek a mikrotiter lemezen megkötött monoklonális antitestekkel (MAB 1) és a tormaperoxidázzal (HRP) jelzett monoklonális antitestekkel (MAB 2). Inkubációs idő eltelté után kialakul a szendvics formátum: (megkötött monoklonális antitest) MAB 1 – humán TNF- α – MAB 2 (monoklonális antitest) – HRP (tormaperoxidázzal jelölt), a lemezt le kell mosni, hogy eltávolítsuk a nem kötődött enzimmel jelölt antitesteket. A megkötődött enzimmel jelölt antitesteket egy kromogén reakcióval mérjük. Kromogén oldatot (TMB) hozzáadjuk, majd inkubáljuk. A reakciót leállítjuk a Leállító oldat hozzáadásával, majd ezután a megadott hullámhosszon leolvassuk a mikrotiter lemezt. A szubsztrát mennyiségét kolorimetriásan határozzuk meg azáltal, hogy mérjük az abszorbanáciát, mely arányos a TNF- α koncentrációjával. Felvesszük a kalibrációs görbét, majd a mintában lévő TNF- α koncentrációt interpolációval kapjuk a kalibrációs görbe alapján. EASIA olvasó használatával (linearitás legfeljebb 3 OD optikai denzitás egység) és a kifinomult adatredukciós módszerrel (polikromatikus adat redukció) kapott eredmények nagy érzékenységgel alacsony és kiterjesztett kalibrációs tartományban is.

V. REAGENS KÉSZLET TARTALMA

Reagens	96 teszt Készlet	Színkód	Összetétel
 Microtiter lemez 96 anti TNF-α (monoklonális antitestekkel) bevont	96 lyuk	kék	Használatra kész.
Ab HRP Konjugát: HRP jelzett anti-TNF-α (monoklonális ellenanyagok) TRIS-maleát pufferben szarvasmarha szérumban albuminnal és timol festékanyaggal	1 ampulla 0.75 ml	piros	Adjon hozzá konjugát puffert (lásd VII.)
CAL 0 Nulla kalibrátor human szérumban, benzamidin és timol festékanyaggal	2 ampulla liofilizált	sárga	Adjon hozzá desztillált vizet (lásd a címkén a pontos mennyiséget).
CAL N Kalibrátor N = 1-től 5-ig (lásd az ampulla címkéjén a pontos mennyiséget) human szérumban, benzamidin és timol festékanyaggal	5 ampulla liofilizált	sárga	Adjon hozzá 2 ml desztillált vizet.
CONJ BUF Konjugát puffer: TRIS-maleát pufferben szarvasmarha szérumban, EDTA és timol festékanyaggal	1 ampulla 6 ml	piros	Használatra kész.
INC BUF Inkubáló puffer: TRIS-maleát pufferben szarvasmarha szérumban, EDTA and timol festékanyaggal	1 ampulla 6 ml	fekete	Használatra kész.
WASH SOLN CONC Koncentrált mosófolyadék (Tris-HCl)	1 ampulla 10 ml	barna	Hígítsa meg 200 szorosára desztillált vízzel (használon mágneses keverőt).
CONTROL N Kontroll - N = 1 vagy 2 humán szérumban, timol festékanyaggal	2 ampulla liofilizált.	ezüst	Adjon hozzá 2 ml desztillált vizet.
CHROM TMB CONC Kromogén TMB (tetra-metil benzidin) dimetilformamidban	1 ampulla 1 ml	zöld	Hígítson meg 0.2 ml-t 1 ampulla szubsztrát pufferben
SUB BUF Szubsztrát puffer: H₂O₂ acetát / citrát puffer	3 ampulla 21 ml	fehér	Használatra kész.
STOP SOLN Leállító oldat: H₂SO₄ 1.8N	1 ampulla 6 ml	fekete	Használatra kész.

Note: 1. Használja a nulla kalibrátort a minta hígításához.
2. 1 pg elkészített kalibrátor megfelel 40 mIU NIBSC IS 87/650-nek.

VI. SZÜKSÉGES ANYAGOK ÉS ESZKÖZÖK

További szükséges anyagok a készlethez:

- 1. nagy tisztaságú desztillált víz
- 2. Pipetták 50 μ l, 200 μ l, 1 ml és 10 ml folyadék bemérésére alkalmasak (ajánlott eldobható, műanyag hegyeket alkalmazni a pipettákhoz)
- 3. Vortex mixer
- 4. Mágneses keverő
- 5. Horizontális microtiter lemezrázó készülék, mely képes 700 rpm $\pm$ 100 rpm fordulatszámra.
- 6. Microtiter lemezmosó.
- 7. Microtiter lemezolvasó, mely képes 450 nm, 490 nm és 650 nm-en (polikromatikus olvasásra) vagy képes 450 nm és 650 nm-en (bikromatikus olvasásra)
- 8. Ajánlott felszerelés: ELISA-AID™ szoftver a polikromatikus lemezolvasáshoz (lásd XIA. pontban), beszerezhető a következő cégtől: Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. REAGENSEK ELŐKÉSZÍTÉSE

- A. **Kalibrátorok:** Oldja fel a nulla kalibrátort az ampulla címkéjén feltüntetett mennyiségű desztillált vízben, a többi kalibrátort 2 ml desztillált vízben oldja.
- B. **Kontrollok:** Oldja fel a kontrollokat 2 ml desztillált vízben.
- C. **Konjugáló oldat:** a következő számú tesztlyukakat használja, hígítsa meg a koncentrált konjugátumot a konjugáló pufferrel egy tiszta üveg fiolába, a pipettázandó mennyiségeket a lent látható táblázatban találja. Célszerű frissen elkészíteni, de a hígított konjugátum 1 hétig eláll 2-8°C-on.

TÁBLÁZAT KONJUGÁLT HÍGÍTÁSAHOZ			
Lyukak száma	Koncentrált konjugált	Konjugáló puffer	Összmenyiség
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. **Felhasználásra kész mosófolyadék:** Készítsen megfelelő mennyiségű elkészített mosóoldatot, úgy hogy egy egységnyi mosóoldathoz 199 egység desztillált vizet ad, vagyis 200 szorosára hígítja. A homogenizálásához használjon mágneses keverőt. A nap végén öntse ki a megmaradt elkészített mosófolyadékot.
- E. **Előhívó oldat:** mérjen 0.2 ml kromogén TMB oldatot egy szubsztrát pufferes ampullába (H₂O₂-os acetát/citrát puffer). Célszerű frissen elkészíteni.

VIII. REAGENSEK TÁROLÁSA ÉS ELTARTHATÓSÁGA

- A készlet reagensi (kinyitás és feloldás előtt) felhasználhatók a csomagoláson feltüntetett szavatossági ideig, amennyiben 2-8°C-on tárolják.
- A fel nem használt tesztcsíkokat 2-8°C-on tárolja, visszazárható, nedvességmegkötő anyagot tartalmazó tasakban szavatossági idejükig.
- A feloldás után a kalibrátorok és kontrollok 2-8°C-on 4 napig stabilak. A hosszabb eltarthatóság érdekében (maximum 2 hónap) tartsa -20°C-on a maradékot. Kerülje az ismételt fagyasztást/kiolvasztást.
- A koncentrált mosófolyadék szoba hőmérsékleten tárolható a lejáratí ideig.
- A frissen elkészített használatra kész mosófolyadékot csak aznap használja fel.
- Az első használat után, a konjugát saját jól záródó üvegében stabil marad 2-8°C-on a szavatossági idejéig.
- A frissen elkészítendő előhívó oldatot maximum 15 perccel a felhasználás előtt készítse el, és tartsa szoba hőfokon, majd öntse ki a maradékot.
- A készlet reagensinek fizikai tulajdonságaiban történt elváltozás arra utal, hogy megromlottak.

IX. MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

- A lehető leghamarabb válasszuk el a szérumot az alvadt vörösvértestektől, majd az alvadás és centrifugálás után 4°C-on tároljuk. Ha a mintákat nem használjuk fel azonnal, akkor -20°C-on tárolhatjuk maximum 2 hónapig, és -70°C-on hosszabb ideig (maximum egy évig).
- Kerüljük a többszöri lefagyasztás/ kiolvasztást.

- Használat előtt, minden minta legyen szobahőfokú. Ajánlott a mintákat Vortex készülékkel homogenizálni felhasználás előtt.
- A mintavételi körülmények befolyásolhatják a kapott eredményeket, ezért fontos, hogy körülmekintően végezzük a mintavételt, hogy elkerüljük a lehetséges szennyeződést, mely stimulálhatja TNF- α terméket véresejtekben, ezáltal hamisan növeli a szérum TNF- α értékét.
- Használjon pirogénmentes gyűjtőcsöveket.

X. A VIZSGÁLAT MENETE

A. Tudnivalók

Ne használjuk a lejárt szavatosságú reagenseket.
Ne keverjük össze egymással több különböző gyártási sorozatba tartozó reagenseket.
Használat előtt várjuk meg, hogy a reagensek szobahőmérsékletűek legyenek.
Keverjük össze az összes reagenst és mintát használat előtt.
Célszerű minden mérést 2 párhuzamossal végezni (kontrollokat, kalibrátorokat és mintákat is beleértve). Függőlegesen egy vonalba legyenek.
Tiszta műanyag edényben készítse el a mosófolyadékok.
A keresztszennyeződés elkerülése érdekében használjon új eldobható pipetta hegyeket a minták és reagensek kimérésénél.
Az előhívó oldat és a leállító oldat adagolásánál vigyázzon, hogy ne érintkezzen a pipetta fém alkatrészével, mert fémmel reakcióba lépnek.
Nagy precizitású vagy automata pipetták használata növeli a mérés precizitását.
Tartsa be az inkubálási időket.
Annak érdekében, hogy elkerüljük a nagy időeltérést az első kalibrátor és az utolsó minta pipettázása között korlátozni kell az említett időt lásd a XIII. paragrafus E pontjában (Eltelt idő).
Mindig vegyen fel kalibrációs görbét a mérés során, ne használja a korábbiakat.
Az előhívó oldatnak szintelennek kell lennie. Ha az összeöntés utáni percekben megkékül az oldat, akkor ne használjuk a reagenst, ki kell dobni.
15 percen belül ossza szét az előhívó oldatot, a lemezmosást követően.
Az előhívó oldattal való inkubálást direkt napfénytől védett helyen végezze.

B. A vizsgálat menete

1. Vegye ki a megfelelő számú tesztcsíkot a védőcsomagolásból. A fel nem használt tesztcsíkokat helyezze vissza a nedvességmegkötő anyagot tartalmazó zacskóba és tárolja 2-8°C-on.
2. Tegye a tesztcsíkokat a tartókeretbe.
3. Pipettázzon 50 μ l inkubáló puffert minden tesztlyukba.
4. Pipettázzon 200 μ l-t mind a Kalibráló, Kontroll és minta oldatokból a megfelelő teszthelyekre.
5. Inkubálja 2 órán át szobahőmérsékleten, közben rázassa síkrázón 700 rpm $\pm$ 100 rpm fordulatszámmal.
6. Szívja le a folyadékokat a tesztlyukakból.
7. Mossa a lemezt 3-szor egymás után:
 - Töltsön 0.4 ml mosófolyadékokat minden lyukba
 - Teljesen szívjuk ki a lyukak tartalmát
8. Pipettázzon 100 μ l-t a nulla kalibrátorból minden csöbe.
9. Mérjen 50 μ l anti- TNF- α -HRP konjugáltat minden tesztlyukba.
10. Inkubálja 2 órán át szobahőmérsékleten, közben rázassa síkrázón 700 rpm $\pm$ 100 rpm fordulatszámmal.
11. Teljesen szívjuk ki a lyukak tartalmát.
12. Mossa a lemezt 3-szor egymás után:
 - Töltsön 0.4 ml mosófolyadékokat minden lyukba
 - Teljesen szívjuk ki a lyukak tartalmát
13. Pipettázzon minden egyes csöbe 200 μ l frissen készített előhívó oldatot lehetőleg 15 percen belül a lemezmosást követően.
14. Inkubálja 2 órán át szobahőmérsékleten, közben rázassa síkrázón 700 rpm $\pm$ 100 rpm fordulatszámmal, védje a direkt napfénytől.
15. Pipettázzon 50 μ l leállító oldatot minden csöbe.
16. Olvassa le az abszorbanciákat 450 nm és 490 nm (referensszűrő 630 nm vagy 650 nm) 3 órán belül és számítsa ki az eredményeket a XI. pontban leírtak alapján.

XI. EREDMÉNYSZÁMÍTÁS

A. Polikromatikus leolvasás:

1. Ebben az esetben ELISA-AID™ szoftverrel készítse el az adatfeldolgozást.
2. A lemezt először 450 nm-es hullámhosszon olvassa le a referens filterrel szemben, melyet 650 nm (vagy 630 nm) állít.
3. A második leolvasásnál 490 nm hullámhosszra állítsa a készüléket és ugyanazzal a referens filterrel szemben olvassa le.
4. Az ELISA-AID™ szoftver automatikusan vezérli az olvasót és integrálja mindkét hullámhosszon kapott eredményt polikromatikus modell szerint. Ezzel a technikával optikai denzitás (abszorbancia, OD) értékeket kapunk, melyek értéke 10 alatt van.

5. A polikromatikus adat feldolgozása a következő elv alapján történik:
 - Xi = optikai denzitás 450 nm hullámhosszon
 - Yi = optikai denzitás 490 nm hullámhosszon
 - Használjunk nem súlyozott lineáris regressziót A és B paraméterek kiszámításához: Y = A*X + B
 - Ha Xi < 3 OD egység, akkor X = Xi
 - Ha Xi > 3 OD egység, akkor X = (Yi-B)/A
 - 4 paraméteres logisztikus görbeillesztést használjon a kalibrációs görbe felvételéhez.
 - A minták TNF- α koncentrációit interpolálással kapja a kalibrációs görbe alapján.

B. Bikromatikus leolvasás

1. A lemezt 450 nm-es hullámhosszon olvassa le a referens filterrel szemben, melyet 650 nm (vagy 630 nm) állít.
2. Számítsa ki az átlagát a párhuzamos mérések eredményeinek.
3. Egy fél-logaritmus vagy lineáris görbén ábrázoljuk a kalibrátorok optikai denzitását az ordinátán (függőleges tengely) a TNF- α koncentrációk függvényében (abscisszán, vízszintes tengely). Rajzoljuk meg a kalibrációs görbét, úgy hogy összekötjük a kapott mérési eredmények értékeit egy egyenessel.
4. Olvassuk le a minden kontroll és minta koncentrációját interpolációval a kalibrációs görbéről.
5. Számítógép vezérelt rendszereknél jóval egyszerűbb ez a kalkuláció. Ha automatikus eredményszámítást használunk 4 paraméteres logisztikus görbeillesztést állítsunk be.

XII. JELLEMZŐ ADATOK

A következő mérési eredmények csak példa értékűek, ne használják a kalibrációs görbeként a méréseknél.

TNF- α -EASIA		Optikai denzitási értékek polikromatikus sugárzásnál
Kalibrátor	0 pg/ml	0.045
	6.8 pg/ml	0.120
	18 pg/ml	0.259
	52 pg/ml	0.619
	176 pg/ml	1.435
	518 pg/ml	3.237

XIII. MINŐSÉGI JELLEMZŐK

A. Kimutatási határ

20 nulla kalibrátort (vakoldatot) vizsgáltak egy másik sorozat kalibrátorral szemben. A kimutatási határ definíció szerint egy látszólagos koncentráció, melyet a nulla kötést tartalmazó oldatok átlagos optikai denzitása felett 2 szórásnyira kapott eredményből számítható ki, jelen esetben 0.7 pg/ml.

B. Specificitás

Keresztreakció nem volt megfigyelhető a következő anyagok jelenlétében 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 és RANTES. Ez a TNF- α módszer specifikusnak tekinthető a humán természetes és rekombináns TNF- α meghatározására.

C. Pontosság (Precision)

VIZSGÁLATON BELÜLI				VIZSGÁLATOK KÖZÖTTI			
szérum	N	<X> $\pm$ SD (pg/ml)	CV (%)	szérum	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 : szórás; CV: relatív szórás

D. Visszanyerhetőség (Accuracy)

VISSZANYERHETŐSÉGI TESZT

Minta	hozzáadott TNF- α (pg/ml)	visszanyert TNF- α (pg/ml)	Visszanyerhe-tőség (%)
Szérum 1	0	6.2	-
	38.4	43.3	97
	83.9	90.0	100
	188.3	192.5	99
	408.2	376.2	91
Szérum 2	0	3.8	-
	38.4	45.5	108
	83.9	91.2	104
	188.3	162.2	84
	408.2	379.2	92

HÍGÍTÁSI TESZT

Minta	Hígítás	Elméleti koncentráció (pg/ml)	Mért koncentráció (pg/ml)
Szérum 1	1	-	436.5
	2	218.3	212.4
	4	109.1	104.8
	8	54.6	59.5
	16	27.3	31.7
Szérum 2	1	-	420.2
	2	210.1	211.2
	4	105.0	98
	8	52.5	58.3
	16	26.3	30.7

A mintákat a nulla kalibrátorral hígítsa.

E. Eltelt idő az utolsó kalibrátor és a minta bemérése között

A következő táblázatban látható, hogy mérési eredmények pontosak maradnak, ha a mintákat 30 perccel később adják a lezárt csövekhez, mint kalibrátort.

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

XIV. BELSŐ MINŐSÉGELLENŐRZÉS

- Ha a Kontroll 1 és 2-re kapott eredmények nem esnek bele az üveg címkéjén megadott tartományba, akkor a kapott eredményeket ne használja, kivéve, ha van valami elfogadható magyarázata az eltérésnek.
- Igény szerint minden laboratórium készíthet saját kontroll mintákat magának, melyet részekre osztva fagyaszttva tároljanak. Ne használjon olyan kontrollt, mely azidot tartalmaz, mert zavarja az enzim reakciót.
- Az elfogadhatósági kritériumot a párhuzamos minták eredményei között a Jó Laboratóriumi Gyakorlatban kell szabályozni.
- Javasoljuk, hogy kontrollokat használják, mint ismeretlen mintákat a mérések során, hogy ellenőrizzék a módszer variabilitását. Fel kell venni a kontrollok minőség ellenőrzési diagramját.
- Nem árt ránézésre ellenőrizni a számítógép által illesztett görbe, mennyire illeszkedik a mérési pontokhoz.

XV. REFERENCIA INTERVALLUMOK

Ezek az értékek csak tájékoztató jellegűek, minden laboratóriumnak el kell készíteni a saját normál értéktartományát.

Tájékoztató, az eredmény 30 szérum mintából (mely látszólag egészséges emberekből származó, alacsony CRP szintű) származik, és 4.6 és 12.4 pg/ml között mozog.

XVI. BIZTONSÁGI ELŐÍRÁSOK

Biztonság

Kizárólag *in vitro* diagnosztikai célokra.

A készletben lévő human vér komponenseket tesztelték európai szabványok és vagy FDA által jóváhagyott módszerekkel, és negatív eredményt adtak HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 és 2 vírusokra. Mivel egyetlen ismert módszer sem garantálja tökéletesen, hogy nincs hepatitis, AIDS vírus vagy egyéb más kórokozó a reagensekben, ezért azokat és minden szérum mintát is fertőző betegséget terjesztésére képes anyagnak kell tekinteni, s helyi biztonsági szabályozásoknak megfelelően kell kezelni.

Minden állati terméket és származékot egészséges állatokból gyűjtöttek. Szarvasmarha származék olyan országból származik, ahol nincs BSE járvány. Ennek ellenére, az állati eredetű komponenseket tartalmazó reagenseket potenciálisan fertőzőként kell kezelni.

Kerülje az összes reagens bőrrel való érintkezését, leállító oldat kénsavat tartalmaz, a kromogén TMB dimetilformamidban van oldva, szubsztrát puffer peroxidot tartalmaz. Ha mégis érintkezne, a bőrünkkel mossuk le alaposan vízzel.

Ne dohányozzon, igyon, egyen és ne használjon semmilyen kozmetikumot a labor területén. Ne pipettázzon szájjal. Használjon védőköpenyt és egyszer használatos gumikesztyűt.

XVII. SZAKIRODALOM

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

XVIII. A PROTOKOLL ÖSSZEFOGLALÓJA

	KALIBRÁTOROK (µl)	MINTA(K) KONTROLLOK (µl)
Inkubáló puffer Kalibrátorok (0-5) Minták, Kontollok	50 200 -	50 - 200
Inkubálja 2 órán át szobahőmérsékleten, közben rázassa síkrázón 700 rpm fordulatszámmal. Szívja le a folyadékot a tesztlyukakból. Mossa 3-szor 400 µl mosófolyadékkal és szívja le.		
Nulla Kalibrátor Anti-TNF- α -HRP konjugált	100 50	100 50
Inkubálja 2 órán át szobahőmérsékleten, közben rázassa síkrázón 700 rpm fordulatszámmal. Szívja le a folyadékot a tesztlyukakból. Mossa 3-szor 400 µl mosófolyadékkal és szívja le.		
Előhívó oldat	200	200
Inkubálja 30 percen át szobahőmérsékleten, közben rázassa síkrázón 700 rpm fordulatszámmal.		
Leállító oldat	50	50
Olvassa le mikrotiter lemezleolvasóval és mérje meg az abszorbanciát minden tesztlyukban 450 nm (és 490 nm-en) hullámhosszon 630 (vagy 650 nm) hullámhosszal szemben.		

DIAsource katalógusszám: KAP1751	P.I. szám: 1700571/en	Felülvizsgálati szám: 110221/1
-------------------------------------	--------------------------	-----------------------------------

			Used symbols
			Consult instructions for use
			Storage temperature
			Use by
LOT			Batch code
REF			Catalogue number
CONTROL			Control
I V D			In vitro diagnostic medical device
			Manufacturer
			Contains sufficient for <n> tests
WASH	SOLN	CONC	Wash solution concentrated
CAL	0		Zero calibrator
CAL	N		Calibrator #
CONTROL	N		Control #
Ag	125I		Tracer
Ab	125I		Tracer
Ag	125I	CONC	Tracer concentrated
Ab	125I	CONC	Tracer concentrated
			Tubes
INC	BUF		Incubation buffer
ACETONITRILE			Acetonitrile
SERUM			Serum
DIL	SPE		Specimen diluent
DIL	BUF		Dilution buffer
ANTISERUM			Antiserum
IMMUNOADSORBENT			Immunoabsorbent
DIL	CAL		Calibrator diluent
REC	SOLN		Reconstitution solution
PEG			Polyethylene glycol
EXTR	SOLN		Extraction solution
ELU	SOLN		Elution solution
GEL			Bond Elut Silica cartridges
PRE	SOLN		Pre-treatment solution
NEUTR	SOLN		Neutralization solution
TRACEUR	BUF		Tracer buffer
µT			Microtiterplate
Ab	HRP		HRP Conjugate
Ag	HRP		HRP Conjugate
Ab	HRP	CONC	HRP Conjugate concentrate
Ag	HRP	CONC	HRP Conjugate concentrate
CONJ	BUF		Conjugate buffer
CHROM	TMB	CONC	Chromogenic TMB concentrate
CHROM	TMB		Chromogenic TMB solution
SUB	BUF		Substrate buffer
STOP	SOLN		Stop solution
INC	SER		Incubation serum
BUF			Buffer
Ab	AP		AP Conjugate
SUB	PNPP		Substrate PNPP
BIOT	CONJ	CONC	Biotin conjugate concentrate
PREC	AGENT		Precipitating Agent
AVID	HRP	CONC	Avidine HRP concentrate
ASS	BUF		Assay buffer
Ab	BIOT		Biotin conjugate
Ab			Specific Antibody
SAV	HRP	CONC	Streptavidin HRP concentrate
NSB			Non-specific binding
2nd Ab			2nd Antibody
ACID	BUF		Acidification Buffer
DIST			Distributor
TRAY			Incubation trays
PMSF			PMSF solution
			Protect from light
STRIP			Dot Strip
SUB			Substrate
EXTR	SOLN	CONC	Extraction Buffer Concentrate
CART			Cartridge
SAV	HRP		Streptavidin HRP
PIPETTE			Pipette
WASH	SOLN		Wash buffer

	Symboles utilisés
	Consulter les instructions d'utilisation
	Température de conservation
	Utiliser jusqu'à
LOT	Numéro de lot
REF	Référence de catalogue
CONTROL	Contrôle
I V D	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Fabricant
	Contenu suffisant pour <n> tests
WASH SOLN CONC	Solution de lavage concentrée
CAL 0	Calibrateur zéro
CAL N	Calibrateur #
CONTROL N	Contrôle #
Ag 125I	Traceur
Ab 125I	Traceur
Ag 125I CONC	Traceur concentré
Ab 125I CONC	Traceur concentré
	Tubes
INC BUF	Tampon d'incubation
ACETONITRILE	Acétonitrile
SERUM	Sérum
DIL SPE	Diluant du spécimen
DIL BUF	Tampon de dilution
ANTISERUM	Antisérum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbant
DIL CAL	Diluant de calibrateur
REC SOLN	Solution de reconstitution
PEG	Glycol Polyéthylène
EXTR SOLN	Solution d'extraction
ELU SOLN	Solution d'élution
GEL	Cartouches Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solution de pré-traitement
NEUTR SOLN	Solution de neutralisation
TRACEUR BUF	Tampon traceur
	Microplaque de titration
Ab HRP	HRP Conjugué
Ag HRP	HRP Conjugué
Ab HRP CONC	HRP Conjugué concentré
Ag HRP CONC	HRP Conjugué concentré
CONJ BUF	Tampon conjugué
CHROM TMB CONC	Chromogène TMB concentré
CHROM TMB	Solution chromogène TMB
SUB BUF	Tampon substrat
STOP SOLN	Solution d'arrêt
INC SER	Sérum d'incubation
BUF	Tampon
Ab AP	AP Conjugué
SUB PNPP	Tampon PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotine conjugué concentré
PREC AGENT	Agent de précipitation
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentré
ASS BUF	Tampon de test
Ab BIOT	Biotine conjugué
Ab	Anticorps spécifique
SAV HRP CONC	Concentré streptavidine HRP
NSB	Liant non spécifique
2nd Ab	Second anticorps
ACID BUF	Tampon d'acidification
DIST	Distributeur
TRAY	Plaque d'incubation
PMSF	Solution PMSF
	Conserver à l'abri de la lumière
STRIP	Bandelette de dots
SUB	Substrat
EXTR SOLN CONC	Tampon d'extraction concentré
CART	Cartouche
SAV HRP	Streptavidine-peroxydase de renfort
PIPETTE	Pipette
WASH SOLN	Tampon de lavage

	<u>Benutzte Symbole</u>
	Gebrauchsanweisung beachten
	Lagern bei
	Verwendbar bis
LOT	Chargenbezeichnung
REF	Bestellnummer
CONTROL	Kontrolle
I V D	In Vitro Diagnostikum
	Hersteller
	Ausreichend für <n> Ansätze
WASH SOLN CONC	Waschlösung-Konzentrat
CAL 0	Null kalibrator
CAL N	Kalibrator #
CONTROL N	Kontrolle #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer Konzentrat
Ab 125I CONC	Tracer Konzentrat
	Röhrchen
INC BUF	Inkubationspuffer
ACETONITRILE	Azetonitril
SERUM	Humanserum
DIL SPE	Probenverdünner
DIL BUF	Verdünnungspuffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunadsorbens
DIL CAL	Kalibratorverdünnung
REC SOLN	Rekonstitutionslösung
PEG	Polyethylenglykol
EXTR SOLN	Extraktionslösung
ELU SOLN	Eluierungslösung
GEL	Bond Elut Silikakartuschen
PRE SOLN	Vorbehandlungslösung
NEUTR SOLN	Neutralisierungslösung
TRACEUR BUF	Tracer-Puffer
	Mikrotiterplatte
Ab HRP	HRP Konjugat
Ag HRP	HRP Konjugat
Ab HRP CONC	HRP Konjugat Konzentrat
Ag HRP CONC	HRP Konjugat Konzentrat
CONJ BUF	Konjugatpuffer
CHROM TMB CONC	Chromogenes TMB Konzentrat
CHROM TMB	Farblösung TMB
SUB BUF	Substratpuffer
STOP SOLN	Stopplösung
INC SER	Inkubationsserum
BUF	Puffer
Ab AP	AP Konjugat
SUB PNPP	Substrat PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin-Konjugat-Konzentrat
PREC AGENT	Fällungsreagenz
AVID HRP CONC	Avidin-HRP-Konzentrat
ASS BUF	Assaypuffer
Ab BIOT	Biotin-Konjugat
Ab	Spezifischer Antikörper
SAV HRP CONC	HRP Streptavidinkonzentrat
NSB	Unspezifische Bindung
2nd Ab	Sekundärer Antikörper
ACID BUF	Ansäuerungspuffer
DIST	Vertreiber
TRAY	Inkubationsschale
PMSF	PMSF Lösung
	Vor Licht schützen
STRIP	Tüpfelstreifen
SUB	Substrat
EXTR SOLN CONC	Konzentrat Extraktionspuffer
CART	Kassette
SAV HRP	Streptavidin HRP
PIPETTE	Pipet
WASH SOLN	Waschpuffer

		Simboli utilizzati			
		Consultare le istruzioni per l'uso			
		Limitazioni di temperatura			
		Utilizzare entro			
LOT		Numero di lotto			
REF		Numero di catalogo			
CONTROL		Controllo			
I V D		Dispositivo medico-diagnostico in vitro			
		Fabbricante			
		Contenuto sufficiente per <n> saggi			
<table><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table>	WASH	SOLN	CONC		Tampone di lavaggio concentrato
WASH	SOLN	CONC			
<table><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table>	CAL	0		Calibratore zero	
CAL	0				
<table><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table>	CAL	N		Standard #	
CAL	N				
<table><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table>	CONTROL	N		Controllo #	
CONTROL	N				
<table><tr><td>Ag</td><td>125I</td></tr></table>	Ag	125I		Marcato	
Ag	125I				
<table><tr><td>Ab</td><td>125I</td></tr></table>	Ab	125I		Marcato	
Ab	125I				
<table><tr><td>Ag</td><td>125I</td><td>CONC</td></tr></table>	Ag	125I	CONC		Marcato concentrato
Ag	125I	CONC			
<table><tr><td>Ab</td><td>125I</td><td>CONC</td></tr></table>	Ab	125I	CONC		Marcato concentrato
Ab	125I	CONC			
		Provette			
<table><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table>	INC	BUF		Tampone incubazione	
INC	BUF				
ACETONITRILE		Acetonitrile			
SERUM		Siero			
<table><tr><td>DIL</td><td>SPE</td></tr></table>	DIL	SPE		Diluyente campione	
DIL	SPE				
<table><tr><td>DIL</td><td>BUF</td></tr></table>	DIL	BUF		Tampone diluizione	
DIL	BUF				
ANTISERUM		Antisiero			
IMMUNOADSORBENT		Immunoassorbente			
<table><tr><td>DIL</td><td>CAL</td></tr></table>	DIL	CAL		Diluyente calibratore	
DIL	CAL				
<table><tr><td>REC</td><td>SOLN</td></tr></table>	REC	SOLN		Soluzione di ricostituzione	
REC	SOLN				
PEG		Polietilenglicole			
<table><tr><td>EXTR</td><td>SOLN</td></tr></table>	EXTR	SOLN		Soluzione di estrazione	
EXTR	SOLN				
<table><tr><td>ELU</td><td>SOLN</td></tr></table>	ELU	SOLN		Soluzione di eluizione	
ELU	SOLN				
GEL		Cartucce di silice bond elut			
<table><tr><td>PRE</td><td>SOLN</td></tr></table>	PRE	SOLN		Soluzione di pretrattamento	
PRE	SOLN				
<table><tr><td>NEUTR</td><td>SOLN</td></tr></table>	NEUTR	SOLN		Soluzione di neutralizzazione	
NEUTR	SOLN				
<table><tr><td>TRACEUR</td><td>BUF</td></tr></table>	TRACEUR	BUF		Tracer Buffer	
TRACEUR	BUF				
		Piastra di microtitolazione			
<table><tr><td>Ab</td><td>HRP</td></tr></table>	Ab	HRP		HRP Coniugato	
Ab	HRP				
<table><tr><td>Ag</td><td>HRP</td></tr></table>	Ag	HRP		HRP Coniugato	
Ag	HRP				
<table><tr><td>Ab</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	Ab	HRP	CONC		HRP Coniugato concentrato
Ab	HRP	CONC			
<table><tr><td>Ag</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	Ag	HRP	CONC		HRP Coniugato concentrato
Ag	HRP	CONC			
<table><tr><td>CONJ</td><td>BUF</td></tr></table>	CONJ	BUF		Buffer coniugato	
CONJ	BUF				
<table><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td><td>CONC</td></tr></table>	CHROM	TMB	CONC		Cromogena TMB concentrato
CHROM	TMB	CONC			
<table><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table>	CHROM	TMB		Soluzione cromogena TMB	
CHROM	TMB				
<table><tr><td>SUB</td><td>BUF</td></tr></table>	SUB	BUF		Tampone substrato	
SUB	BUF				
<table><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table>	STOP	SOLN		Soluzione di arresto	
STOP	SOLN				
<table><tr><td>INC</td><td>SER</td></tr></table>	INC	SER		Incubazione con siero	
INC	SER				
BUF		Buffer			
<table><tr><td>Ab</td><td>AP</td></tr></table>	Ab	AP		AP Coniugato	
Ab	AP				
<table><tr><td>SUB</td><td>PNPP</td></tr></table>	SUB	PNPP		Substrato PNPP	
SUB	PNPP				
<table><tr><td>BIOT</td><td>CONJ</td><td>CONC</td></tr></table>	BIOT	CONJ	CONC		Concentrato coniugato con biotina
BIOT	CONJ	CONC			
<table><tr><td>PREC</td><td>AGENT</td></tr></table>	PREC	AGENT		Agente precipitante	
PREC	AGENT				
<table><tr><td>AVID</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	AVID	HRP	CONC		Concentrato avidina HRP
AVID	HRP	CONC			
<table><tr><td>ASS</td><td>BUF</td></tr></table>	ASS	BUF		Soluzione tampone per test	
ASS	BUF				
<table><tr><td>Ab</td><td>BIOT</td></tr></table>	Ab	BIOT		Coniugato con biotina	
Ab	BIOT				
Ab		Anticorpo Specifico			
<table><tr><td>SAV</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	SAV	HRP	CONC		Streptavidina-HRP concentrata
SAV	HRP	CONC			
NSB		Legame non-specifico			
2nd Ab		2° Anticorpo			
<table><tr><td>ACID</td><td>BUF</td></tr></table>	ACID	BUF		Tampone Acidificante	
ACID	BUF				
DIST		Distributore			
TRAY		Vassoi di incubazione			
PMSF		Soluzione di PMSF			
		Proteggere dalla luce			
STRIP		Dot strip			
SUB		Substrato			
<table><tr><td>EXTR</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table>	EXTR	SOLN	CONC		Concentrato del tampone di estrazione
EXTR	SOLN	CONC			
CART		Cartuccia			
<table><tr><td>SAV</td><td>HRP</td></tr></table>	SAV	HRP		HRP coniugata a streptavidina	
SAV	HRP				
PIPETTE		Pipetta			
<table><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td></tr></table>	WASH	SOLN		Tampone di lavaggio	
WASH	SOLN				

	Χρησιμοποιούμενα σύμβολα			
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης			
	Θερμοκρασία αποθήκευσης			
	Ημερομηνία λήξης			
LOT	Αριθμός παρτίδας			
REF	Αριθμός καταλόγου			
CONTROL	Πρότυπο ελέγχου			
IVD	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν			
	Κατασκευαστής			
	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις			
<table><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table>	WASH	SOLN	CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης
WASH	SOLN	CONC		
<table><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table>	CAL	0	Μηδενικός βαθμονομητής	
CAL	0			
<table><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table>	CAL	N	Βαθμονομητής #	
CAL	N			
<table><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table>	CONTROL	N	Ορός ελέγχου #	
CONTROL	N			
<table><tr><td>Ag</td><td>12SI</td></tr></table>	Ag	12SI	Ιχνηθέτης	
Ag	12SI			
<table><tr><td>Ab</td><td>12SI</td></tr></table>	Ab	12SI	Ιχνηθέτης	
Ab	12SI			
<table><tr><td>Ag</td><td>12SI</td><td>CONC</td></tr></table>	Ag	12SI	CONC	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης
Ag	12SI	CONC		
<table><tr><td>Ab</td><td>12SI</td><td>CONC</td></tr></table>	Ab	12SI	CONC	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης
Ab	12SI	CONC		
	Σωληνάρια			
<table><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table>	INC	BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης	
INC	BUF			
<table><tr><td>ACETONITRILE</td></tr></table>	ACETONITRILE	Ακετονιτρίλιο		
ACETONITRILE				
<table><tr><td>SERUM</td></tr></table>	SERUM	Ορός		
SERUM				
<table><tr><td>DIL</td><td>SPE</td></tr></table>	DIL	SPE	Διάλυμα αραιώσης δειγμάτων	
DIL	SPE			
<table><tr><td>DIL</td><td>BUF</td></tr></table>	DIL	BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης	
DIL	BUF			
<table><tr><td>ANTISERUM</td></tr></table>	ANTISERUM	Αντιορός		
ANTISERUM				
<table><tr><td>IMMUNOADSORBENT</td></tr></table>	IMMUNOADSORBENT	Ανοσοπροσροφητικό		
IMMUNOADSORBENT				
<table><tr><td>DIL</td><td>CAL</td></tr></table>	DIL	CAL	Αραιωτικό βαθμονομητών	
DIL	CAL			
<table><tr><td>REC</td><td>SOLN</td></tr></table>	REC	SOLN	Διάλυμα ανασύστασης	
REC	SOLN			
<table><tr><td>PEG</td></tr></table>	PEG	Πολυαιθυλενογλυκόλη		
PEG				
<table><tr><td>EXTR</td><td>SOLN</td></tr></table>	EXTR	SOLN	Διάλυμα εκχύλισης	
EXTR	SOLN			
<table><tr><td>ELU</td><td>SOLN</td></tr></table>	ELU	SOLN	Διάλυμα έκλουσης	
ELU	SOLN			
<table><tr><td>GEL</td></tr></table>	GEL	Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut		
GEL				
<table><tr><td>PRE</td><td>SOLN</td></tr></table>	PRE	SOLN	Διάλυμα προεπεξεργασίας	
PRE	SOLN			
<table><tr><td>NEUTR</td><td>SOLN</td></tr></table>	NEUTR	SOLN	Διάλυμα εξουδετέρωσης	
NEUTR	SOLN			
<table><tr><td>TRACEUR</td><td>BUF</td></tr></table>	TRACEUR	BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα	
TRACEUR	BUF			
	Πλάκα μικροτιτλοδότησης			
<table><tr><td>Ab</td><td>HRP</td></tr></table>	Ab	HRP	HRP Σύζευγμα	
Ab	HRP			
<table><tr><td>Ag</td><td>HRP</td></tr></table>	Ag	HRP	HRP Σύζευγμα	
Ag	HRP			
<table><tr><td>Ab</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	Ab	HRP	CONC	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα
Ab	HRP	CONC		
<table><tr><td>Ag</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	Ag	HRP	CONC	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα
Ag	HRP	CONC		
<table><tr><td>CONJ</td><td>BUF</td></tr></table>	CONJ	BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος	
CONJ	BUF			
<table><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td><td>CONC</td></tr></table>	CHROM	TMB	CONC	Χρωμογόνος TMB
CHROM	TMB	CONC		
<table><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table>	CHROM	TMB	Διάλυμα χρωμογόνου TMB	
CHROM	TMB			
<table><tr><td>SUB</td><td>BUF</td></tr></table>	SUB	BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος	
SUB	BUF			
<table><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table>	STOP	SOLN	Ανασχετικό αντιδραστήριο	
STOP	SOLN			
<table><tr><td>INC</td><td>SER</td></tr></table>	INC	SER	Ορός επώασης	
INC	SER			
<table><tr><td>BUF</td></tr></table>	BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα		
BUF				
<table><tr><td>Ab</td><td>AP</td></tr></table>	Ab	AP	AP Σύζευγμα	
Ab	AP			
<table><tr><td>SUB</td><td>PNPP</td></tr></table>	SUB	PNPP	PNPP υποστρώματος	
SUB	PNPP			
<table><tr><td>BIOT</td><td>CONJ</td><td>CONC</td></tr></table>	BIOT	CONJ	CONC	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη
BIOT	CONJ	CONC		
<table><tr><td>PREC</td><td>AGENT</td></tr></table>	PREC	AGENT	Παράγοντας καθίζησης	
PREC	AGENT			
<table><tr><td>AVID</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	AVID	HRP	CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP
AVID	HRP	CONC		
<table><tr><td>ASS</td><td>BUF</td></tr></table>	ASS	BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού	
ASS	BUF			
<table><tr><td>Ab</td><td>BIOT</td></tr></table>	Ab	BIOT	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	
Ab	BIOT			
<table><tr><td>Ab</td></tr></table>	Ab	Ειδικό Αντίσωμα		
Ab				
<table><tr><td>SAV</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	SAV	HRP	CONC	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεξευγμένη με HRP
SAV	HRP	CONC		
<table><tr><td>NSB</td></tr></table>	NSB	μη-ειδική δέσμευση		
NSB				
<table><tr><td>2nd Ab</td></tr></table>	2nd Ab	2ο Αντίσωμα		
2nd Ab				
<table><tr><td>ACID</td><td>BUF</td></tr></table>	ACID	BUF	Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο	
ACID	BUF			
<table><tr><td>DIST</td></tr></table>	DIST	Διανομέας		
DIST				
<table><tr><td>TRAY</td></tr></table>	TRAY	Δίσκοι επώασης		
TRAY				
<table><tr><td>PMSF</td></tr></table>	PMSF	Διάλυμα PMSF		
PMSF				
	Προστατεύετε από το φως			
<table><tr><td>STRIP</td></tr></table>	STRIP	Ταινία κουκκίδων		
STRIP				
<table><tr><td>SUB</td></tr></table>	SUB	Υπόστρωμα		
SUB				
<table><tr><td>EXTR</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table>	EXTR	SOLN	CONC	Συμπύκνωμα ρυθμ. διαλύματος εκχύλισης
EXTR	SOLN	CONC		
<table><tr><td>CART</td></tr></table>	CART	Φύσιγγα		
CART				
<table><tr><td>SAV</td><td>HRP</td></tr></table>	SAV	HRP	Στρεπταβιδίνη HRP	
SAV	HRP			
<table><tr><td>PIPETTE</td></tr></table>	PIPETTE	πιπέτα		
PIPETTE				
<table><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td></tr></table>	WASH	SOLN	Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης	
WASH	SOLN			

	Használt szimbólumok			
	Olvassa el a használati útmutatót			
	Tárolási hőmérséklet			
	Lejáratí idő			
LOT	Gyártási kód			
REF	Katalógus szám			
CONTROL	Kontrol			
I V D	In vitro diagnosztikai eszköz			
	Gyártó			
	Tartalma <n> teszt elvégzésére elegendő			
<table><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table>	WASH	SOLN	CONC	Mosó folyadék koncentrátum
WASH	SOLN	CONC		
<table><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table>	CAL	0	Zero kalibrátor	
CAL	0			
<table><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table>	CAL	N	Kalibrátor #	
CAL	N			
<table><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table>	CONTROL	N	Kontrol #	
CONTROL	N			
<table><tr><td>Ag</td><td>125I</td></tr></table>	Ag	125I	Nyomjelző izotóp	
Ag	125I			
<table><tr><td>Ab</td><td>125I</td></tr></table>	Ab	125I	Nyomjelző izotóp	
Ab	125I			
<table><tr><td>Ag</td><td>125I</td><td>CONC</td></tr></table>	Ag	125I	CONC	Nyomjelző izotóp koncentrátum
Ag	125I	CONC		
<table><tr><td>Ab</td><td>125I</td><td>CONC</td></tr></table>	Ab	125I	CONC	Nyomjelző izotóp koncentrátum
Ab	125I	CONC		
	Csővek			
<table><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table>	INC	BUF	Inkubáló puffer	
INC	BUF			
<table><tr><td>ACETONITRILE</td></tr></table>	ACETONITRILE	Acetonitril		
ACETONITRILE				
<table><tr><td>SERUM</td></tr></table>	SERUM	Szérum		
SERUM				
<table><tr><td>DIL</td><td>SPE</td></tr></table>	DIL	SPE	Mintahígító	
DIL	SPE			
<table><tr><td>DIL</td><td>BUF</td></tr></table>	DIL	BUF	Hígító puffer	
DIL	BUF			
<table><tr><td>ANTISERUM</td></tr></table>	ANTISERUM	Antiszérum		
ANTISERUM				
<table><tr><td>IMMUNOADSORBENT</td></tr></table>	IMMUNOADSORBENT	Immunadszorbens		
IMMUNOADSORBENT				
<table><tr><td>DIL</td><td>CAL</td></tr></table>	DIL	CAL	Kalibrátor hígító	
DIL	CAL			
<table><tr><td>REC</td><td>SOLN</td></tr></table>	REC	SOLN	Mintaelőkészítő oldat	
REC	SOLN			
<table><tr><td>PEG</td></tr></table>	PEG	Polietilén glikol		
PEG				
<table><tr><td>EXTR</td><td>SOLN</td></tr></table>	EXTR	SOLN	Extrakciós oldat	
EXTR	SOLN			
<table><tr><td>ELU</td><td>SOLN</td></tr></table>	ELU	SOLN	Eluáló oldat	
ELU	SOLN			
<table><tr><td>GEL</td></tr></table>	GEL	Bond Elut Silica szilikagél patronok		
GEL				
<table><tr><td>PRE</td><td>SOLN</td></tr></table>	PRE	SOLN	Előkezelő oldat	
PRE	SOLN			
<table><tr><td>NEUTR</td><td>SOLN</td></tr></table>	NEUTR	SOLN	Semlegesítő oldat	
NEUTR	SOLN			
<table><tr><td>TRACEUR</td><td>BUF</td></tr></table>	TRACEUR	BUF	Nyomjelző izotóp hígító puffer	
TRACEUR	BUF			
	Mikrotiter lemez			
<table><tr><td>Ab</td><td>HRP</td></tr></table>	Ab	HRP	HRP konjugátum	
Ab	HRP			
<table><tr><td>Ag</td><td>HRP</td></tr></table>	Ag	HRP	HRP konjugátum	
Ag	HRP			
<table><tr><td>Ab</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	Ab	HRP	CONC	HRP konjugátum koncentrátum
Ab	HRP	CONC		
<table><tr><td>Ag</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	Ag	HRP	CONC	HRP konjugátum koncentrátum
Ag	HRP	CONC		
<table><tr><td>CONJ</td><td>BUF</td></tr></table>	CONJ	BUF	Konjugátum puffer	
CONJ	BUF			
<table><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td><td>CONC</td></tr></table>	CHROM	TMB	CONC	Kromogén TMB koncentrátum
CHROM	TMB	CONC		
<table><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table>	CHROM	TMB	Kromogén TMB oldat	
CHROM	TMB			
<table><tr><td>SUB</td><td>BUF</td></tr></table>	SUB	BUF	Szubsztrát puffer	
SUB	BUF			
<table><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table>	STOP	SOLN	Stop oldat	
STOP	SOLN			
<table><tr><td>INC</td><td>SER</td></tr></table>	INC	SER	Inkubációs szérum	
INC	SER			
<table><tr><td>BUF</td></tr></table>	BUF	Puffer		
BUF				
<table><tr><td>Ab</td><td>AP</td></tr></table>	Ab	AP	AP konjugátum	
Ab	AP			
<table><tr><td>SUB</td><td>PNPP</td></tr></table>	SUB	PNPP	Szubsztrát PNPP	
SUB	PNPP			
<table><tr><td>BIOT</td><td>CONJ</td><td>CONC</td></tr></table>	BIOT	CONJ	CONC	Biotin konjugátum koncentrátum
BIOT	CONJ	CONC		
<table><tr><td>PREC</td><td>AGENT</td></tr></table>	PREC	AGENT	Kicsapató reagens	
PREC	AGENT			
<table><tr><td>AVID</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	AVID	HRP	CONC	Avidin HRP koncentrátum
AVID	HRP	CONC		
<table><tr><td>ASS</td><td>BUF</td></tr></table>	ASS	BUF	Vizsgálati puffer	
ASS	BUF			
<table><tr><td>Ab</td><td>BIOT</td></tr></table>	Ab	BIOT	Biotin konjugátum	
Ab	BIOT			
<table><tr><td>Ab</td></tr></table>	Ab	Specifikus ellenanyag		
Ab				
<table><tr><td>SAV</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	SAV	HRP	CONC	Sztreptavidin HRP koncentrátum
SAV	HRP	CONC		
<table><tr><td>NSB</td></tr></table>	NSB	Nem-specifikus kötődés		
NSB				
<table><tr><td>2nd Ab</td></tr></table>	2nd Ab	Másodlagos ellenanyag		
2nd Ab				
<table><tr><td>ACID</td><td>BUF</td></tr></table>	ACID	BUF	Savas puffer	
ACID	BUF			
<table><tr><td>DIST</td></tr></table>	DIST	Elosztó		
DIST				
<table><tr><td>TRAY</td></tr></table>	TRAY	Inkubációs tálcák		
TRAY				
<table><tr><td>PMSF</td></tr></table>	PMSF	PMSF-oldat		
PMSF				
	Fénytől védendő			
<table><tr><td>STRIP</td></tr></table>	STRIP	Pontcsík		
STRIP				
<table><tr><td>SUB</td></tr></table>	SUB	Szubsztrát		
SUB				
<table><tr><td>EXTR</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table>	EXTR	SOLN	CONC	Extrakciós puffer-koncentrátum
EXTR	SOLN	CONC		
<table><tr><td>CART</td></tr></table>	CART	Kazetta		
CART				
<table><tr><td>SAV</td><td>HRP</td></tr></table>	SAV	HRP	Sztreptavidin torna peroxidáz (HRP)	
SAV	HRP			
<table><tr><td>PIPETTE</td></tr></table>	PIPETTE	Pipetta		
PIPETTE				
<table><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td></tr></table>	WASH	SOLN	Mosópuffer	
WASH	SOLN			