

TNF- α -ELISA

KAP1751

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

History

Summary of change:

Current Version: 230123
New logo



Read entire protocol before use.

TNF- α -ELISA

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 -ELISA 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 -ELISA 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 ELISA reader (linearity up to 3 OD units) and a sophisticated data reduction method (polychromatic data reduction) result in a high sensitivity in the low range and in an extended calibration range.

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			
<table border="1" data-bbox="71 907 263 952"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Conjugate: HRP labelled anti-TNF- α (monoclonal antibodies) in TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin and thymol	Ab	HRP	CONC	1 vial 0.75 ml	red	Add conjugate buffer (see section VII)
Ab	HRP	CONC				
<table border="1" data-bbox="111 1064 231 1108"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Zero calibrator in human plasma, benzamidine and thymol	CAL	0	2 vials lyophil.	yellow	Add distilled water (see on the label for the exact volume)	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="103 1176 239 1220"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibrator N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in human plasma, benzamidine and thymol	CAL	N	5 vials lyophil.	yellow	Add 2 ml distilled water	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="87 1310 255 1355"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Conjugate buffer: TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin, EDTA and thymol	CONJ	BUF	1 vial 6 ml	red	Ready for use	
CONJ	BUF					
<table border="1" data-bbox="87 1456 255 1500"> <tr> <td>INC</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Incubation buffer: TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin, EDTA and thymol	INC	BUF	1 vial 6 ml	black	Ready for use	
INC	BUF					
<table border="1" data-bbox="103 1601 295 1646"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Wash Solution (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	brown	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="103 1702 263 1747"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controls - N = 1 or 2 in human plasma and thymol	CONTROL	N	2 vials lyophil.	silver	Add 2 ml distilled water	
CONTROL	N					
<table border="1" data-bbox="71 1803 311 1848"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> </tr> </table> Chromogen TMB (Tetramethylbenzidine)	CHROM	TMB	1 vial 12 ml	brown	Ready for use	
CHROM	TMB					
<table border="1" data-bbox="87 1915 279 1960"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Stopping solution: HCl 1.0N	STOP	SOLN	1 vial 12 ml	white	Ready for use	
STOP	SOLN					

- Note:**
- Use the zero calibrator for sample dilutions.
 - 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)

VII. REAGENT PREPARATION

- 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.
- Controls** : Reconstitute the controls with 2 ml distilled water.
- 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

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

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the vial label, if kept at 2 to 8°C.
- Unused strips must be stored, at 2-8°C, in a sealed bag containing a desiccant until expiration date.
- After reconstitution, calibrators and controls are stable for 4 days at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 2 months. Avoid successive freeze thaw cycles.
- The concentrated Wash Solution is stable at 18 - 25°C until expiration date.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, the conjugate is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

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 18 - 25°C. It is recommended to vortex the samples before use.
- Sampling conditions can affect values, therefore, strict precautions have to be taken during sampling to avoid impurities contained in sampling materials that would stimulate TNF- α production by blood cells and thus falsely increase serum TNF- α values.
- Collection tubes must be pyrogen-free.

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 18 - 25°C prior to use.
 Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
 Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
 Use a clean plastic container to prepare the Wash Solution.
 In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
 For the dispensing of the Revelation Solution and the Stop Solution avoid pipettes with metal parts.
 High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
 Respect the incubation times.
 To avoid drift, the time between pipetting of the first calibrator and the last sample must be limited to the time mentioned in section 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 µl of incubation buffer into all the wells
4. Pipette 200 µl of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
5. Incubate for 2 hours at 18 - 25°C on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm.
6. Aspirate the liquid from each well.
7. Wash the plate 3 times by:
 - Dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well
 - Aspirating the content of each well
8. Pipette 100 µl of zero calibrator into all the wells
9. Pipette 50 µl of anti- TNF-α -HRP conjugate into all the wells.
10. Incubate for 2 hours at 18 - 25°C on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm.
11. Aspirate the liquid from each well.
12. Wash the plate 3 times by:
 - Dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well
 - Aspirating the content of each well
13. Pipette 100 µl of the revelation solution into each well within 15 minutes following the washing step.
14. Incubate the microtiterplate for 15 minutes at 18 - 25°C on a horizontal shaker set at 700 rpm ± 100 rpm, avoid direct sunlight.
15. Pipette 100 µl of Stop solution into each well.
16. Read the absorbencies at 450 nm and 490 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 30 minutes and calculate the results as described in section XI.

XI. CALCULATION OF RESULTS

A. Polychromatic Reading:

1. In this case, the software will do the data processing.
2. The plate is first read at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
3. A second reading is performed at 490 nm against the same reference filter.
4. The Software will drive the reader automatically and will integrate both readings into a polychromatic model. This technique can generate OD's up to 10.
5. The principle of polychromatic data processing is as follows:
 - $X_i = OD$ at 450 nm
 - $Y_i = OD$ at 490 nm
 - Using a standard unweighted linear regression, the parameters A & B are calculated : $Y = A*X + B$
 - If $X_i < 3$ OD units, then X calculated = X_i
 - If $X_i > 3$ OD units, then X calculated = $(Y_i - B)/A$
 - A 4 parameter logistic curve fitting is used to build up the calibration curve.

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

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

C. Precision

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 : 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 Practises
- It is recommended that controls be routinely assayed as unknown samples to measure assay variability. The performance of the assay should be monitored with quality control charts of the controls.
- It is good practise to check visually the curve fit selected by the computer.

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 HCl. In case of contact, wash thoroughly with water.

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

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. 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 18 - 25°C with continuous shaking at 700 rpm. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 μ l of Wash Solution and aspirate.		
Zero Calibrator	100	100
Anti-TNF- α -HRP conjugate	50	50
Incubate for 2 hours at 18 - 25°C with continuous shaking at 700 rpm. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 μ l of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic solution	100	100
Incubate for 15 min at 18 - 25°C with continuous shaking at 700 rpm.		
Stop Solution	100	100
Read on a microtiterplate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (and 490 nm) versus 630 (or 650 nm)		

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

TNF- α -ELISA

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 -ELISA 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

Le kit DIAsource TNF- α -ELISA est un « Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay » en phase solide effectué 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 ELISA (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			
<table border="1" data-bbox="71 925 256 958"><tr><td>Ab</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table> Conjugué: anti-TNF- α marqué avec de l'HRP (anticorps monoclonal) dans un tampon TRIS-maléate avec de l'albumine bovine et du thymol	Ab	HRP	CONC	1 flacon 0,75 ml	Rouge	Ajouter le tampon du conjugué (voir section VII)
Ab	HRP	CONC				
<table border="1" data-bbox="71 1070 204 1104"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrateur zéro dans du plasma humain avec de la benzamidine et du thymol	CAL	0	2 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter de l'eau distillée (voir le volume exact sur l'étiquette)	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="71 1193 212 1227"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrateur N = 1 à 5 (cfr. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans du plasma humain avec de la benzamidine et du thymol	CAL	N	5 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 2 ml d'eau distillée	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="71 1350 256 1384"><tr><td>CONJ</td><td>BUF</td></tr></table> Tampon conjugué: Tampon TRIS-maléate avec de l'albumine bovine, EDTA et du thymol	CONJ	BUF	1 flacon 6 ml	Rouge	Prêt à l'emploi	
CONJ	BUF					
<table border="1" data-bbox="71 1507 240 1541"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Tampon d'incubation: Tampon TRIS-maléate avec de l'albumine bovine, EDTA et du thymol	INC	BUF	1 flacon 6 ml	Noir	Prêt à l'emploi	
INC	BUF					
<table border="1" data-bbox="71 1619 268 1653"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solution de Lavage (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	Brun	Diluer 200 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="71 1731 240 1765"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Contrôles - N = 1 ou 2 dans du plasma humain avec du thymol	CONTROL	N	2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 2 ml d'eau distillée	
CONTROL	N					
<table border="1" data-bbox="71 1843 272 1877"><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td><td>CONC</td></tr></table> Chromogène TMB (Tetramethylbenzidine)	CHROM	TMB	CONC	1 flacon 12 ml	Vert	Prêt à l'emploi
CHROM	TMB	CONC				
<table border="1" data-bbox="71 1955 212 1989"><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> Solution d'arrêt: HCl 1.0N	STOP	SOLN	1 flacon 12 ml	Blanc	Prêt à l'emploi	
STOP	SOLN					

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. MATERIEL NON FOURNI

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)

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- 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.
- Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 2 ml d'eau distillée.
- 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

- Solution de Lavage** : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 199 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (200x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Des barrettes inutilisées doivent être gardées, à 2-8°C, dans un sachet cacheté contenant un dessiccant jusqu'à la date d'expiration.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables pendant 4 jours entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquotes devront être réalisées et celles-ci seront gardées à -20°C pendant 2 mois. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage concentrée est stable à 18 - 25°C jusqu'à la date d'expiration.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le conjugué est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Le sérum doit être débarrassé le plus rapidement possible du caillot de globules rouges après coagulation et centrifugation. Il doit être conservé à 4°C. Si les échantillons ne sont pas tout de suite utilisés, ils doivent être conservés à -70°C, au maximum pendant 1 an.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Avant l'utilisation des échantillons, ceux-ci doivent être amenés à 18 - 25°C. 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 18 - 25°C avant utilisation.

Mélangez tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce.

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

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

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

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

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

Respecter les temps d'incubation.

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

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

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

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

B. Mode opératoire

- Sélectionner le nombre de barrettes nécessaires pour le test. Les barrettes inutilisées doivent être cachetées de nouveau dans le sachet avec un dessiccant 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 18 - 25°C 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 18 - 25°C 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 de la Solution Chromogénique dans chaque puits dans les 15 minutes après la phase de lavage.
- Incuber la microplaque pendant 15 minutes à 18 - 25°C dans un agitateur horizontal mis à 700 rpm ± 100 rpm, éviter l'exposition à la lumière du soleil.
- Pipeter 100 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 30 minutes et calculer les résultats comme décrits dans la section XI.

XI. CALCUL DES RESULTATS

A. Lecture polychromatique:

- En ce cas, le software 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 manœvrera 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:
 - $X_i = DO$ à 450 nm
 - $Y_i = DO$ à 490 nm
 - Utilisant une régression linéaire non pondérée standard, les paramètres A & B sont calculés : $Y = A * X + B$
 - 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-ELISA		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-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 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 ait été ajouté aux puits.

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'azoture influenceront la réaction enzymatique et ne peuvent pas être utilisés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en double des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.
- On recommande que les contrôles soient testés de façon routinière comme des échantillons inconnus pour mesurer la variabilité du test. La réalisation du test doit être suivie avec des fichiers de contrôle de qualité des contrôles.
- On recommande de vérifier visuellement le lissage de 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'HCl. En cas de contact, laver avec beaucoup d'eau.

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

XVII. BIBLIOGRAPHIE

- 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

	CALBRATEURS (µl)	ECHANTILLON(S) CONTROLES (µl)
Tampon d'incubation	50	50
Calibrateurs (0-5)	200	-
Echantillons, Contrôles	-	200
Incuber pendant 2 heures à 18 - 25°C 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	100	100
Conjugué Anti-TNF- α -HRP	50	50
Incuber pendant 2 heures à 18 - 25°C 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 chromogène	100	100
Incuber pendant 15 min à 18 - 25°C avec agitation continue à 700 rpm.		
Solution d'arrêt	100	100
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)		

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

TNF- α -ELISA

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 -ELISA 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 wohlbekanntes *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 Hämofiltration und während der *in vivo* Therapie mit Zytokinen (IL-2) usw. beschrieben. Neben eines Verständnisses für die Pathogenese können diese Bestimmungen Hilfe bei der Diagnose leisten (z.B. bei der Abstoßung von Transplantaten) und haben eine prognostische Bedeutung (z.B. bei systemischen Infektionen).

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DIASource TNF- α -ELISA ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay (ELISA) im Mikrotiterplattenformat. Der Assay benutzt monoklonale Antikörper (MAbs), die gegen verschiedene Epitope von TNF- α gerichtet sind. 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 enzymbeschriebene Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Gebundene enzymbeschriebene 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 Substratsatz wird kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die proportional zur TNF- α -Konzentration ist.

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

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Tests Kit	Farb-Code	Rekonstitution			
 Mikrotiterplatte mit 96 anti TNF- α -beschichtete Wells (monoklonale Antikörper)	96 Wells	Blau	gebrauchsfertig			
<table border="1" data-bbox="76 947 263 981"><tr><td>Ab</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table> Konjugat: MRP beschriftete Anti-TNF- α (monoklonale Antikörper) in TRIS-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin und Thyamol	Ab	HRP	CONC	1 Gefäß 0,75 ml	Rot	Konjugatpuffer zugeben (beachten sie Abschnitt VII)
Ab	HRP	CONC				
<table border="1" data-bbox="76 1099 204 1133"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Null-Kalibrator in Humanplasma mit Benzamidin und Thyamol	CAL	0	2 Gefäße lyophilisiert	Gelb	Dest. Wasser zugeben (das exakte Volumen bitte dem Etikett entnehmen)	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="76 1211 212 1245"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibrator - N = 1 bis 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanplasma mit Benzamidin und Thyamol	CAL	N	5 Gefäße lyophilisiert	Gelb	2 ml dest. Wasser zugeben	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="89 1361 260 1395"><tr><td>CONJ</td><td>BUF</td></tr></table> Konjugatpuffer: TRIS-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin, EDTA und Thyamol	CONJ	BUF	1 Gefäß 6 ml	Rot	gebrauchsfertig	
CONJ	BUF					
<table border="1" data-bbox="89 1536 240 1570"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Inkubationspuffer: TRIS-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin, EDTA und Thyamol	INC	BUF	1 Gefäß 6 ml	Schwarz	gebrauchsfertig	
INC	BUF					
<table border="1" data-bbox="76 1675 268 1709"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Waschlösung (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 Gefäß 10 ml	Braun	200 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetprüher benutzen).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="76 1787 240 1821"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontrollen - N = 1 oder 2 Humanplasma mit Thyamol	CONTROL	N	2 Gefäße lyophilisiert	Silber	2 ml dest. Wasser zugeben	
CONTROL	N					
<table border="1" data-bbox="76 1899 236 1933"><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table> Chromogenes TMB (Tetramethylbenzidin)	CHROM	TMB	1 Gefäß 12 ml	Braun	gebrauchsfertig	
CHROM	TMB					
<table border="1" data-bbox="76 2011 212 2045"><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> Stopplösung: HCl 1,0N	STOP	SOLN	1 Gefäß 12 ml	Weiß	gebrauchsfertig	
STOP	SOLN					

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
- Magnetprüher
- 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)

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- 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.
- Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 2 ml dest. Wasser.
- 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

- Waschlösung:** Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (200x) mit 199 Anteilen dest. Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetprüher zum gleichmäßigen Durchmischen. Werfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages weg.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder der Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2°C bis 8°C stabil.
- Nicht verwendete Mikrotiterstreifen sollten bis zum Verfallsdatum dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2° bis 8°C gelagert werden.
- Nach der Rekonstitution sind die Kalibratoren und Kontrollen bei 2°C bis 8°C 4 Tage stabil. Aliquots müssen bei längerer Aufbewahrung bei -20°C eingefroren werden, dann sind Sie 2 Monate haltbar. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Die konzentrierte Waschlösung ist bei 18 - 25°C bis zum Verfallsdatum haltbar.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist das Konjugat bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2° bis 8° C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Das Serum muss so schnell wie möglich vom Blutgerinnsel der roten Zellen nach Gerinnung und Zentrifugation getrennt und bei 4°C aufbewahrt werden. Werden die Proben nicht direkt benutzt, müssen sie bei -70°C für maximal 1 Jahr gelagert werden.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Vor Gebrauch müssen alle Proben 18 - 25°C 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.
- Sammelnröhrchen 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 18 - 25°C. Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.

Führen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben doppelt aus. Vertikale Ausrichtung wird empfohlen.

Verwenden Sie zur Zubereitung der Waschlösung reinen Kunststoffbehälter.

Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.

Verwenden Sie zur Pipettierung der Substratlösung und der Stopplösung keine Pipetten mit Metallteilen.

Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.

Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.

Zur Vermeidung von Drift muss die Zeit zwischen dem Pipettieren des ersten Kalibrators und der letzten Probe auf die Zeit beschränkt werden, die in Abschnitt 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

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

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

A. Polychromatische Auswertung:

- In diesem Fall werden die Daten durch die Software verarbeitet.
- Die Platte wird zunächst bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) ausgewertet.
- Eine zweite Auswertung erfolgt bei 490 nm gegen denselben Referenzfilter.
- Die Software steuert das Lesegerät automatisch und integriert beide Auswertungen in ein polychromatisches Modell. Diese Technik kann ODS bis 10 erstellen.
- Das Prinzip der polychromatischen Datenauswertung funktioniert wie folgt:
 - $X_i = OD$ bei 450 nm
 - $Y_i = OD$ bei 490 nm
 - Standard nicht gewichtet lineare Regression, Parameter A & B werden berechnet: $Y = A \cdot X + B$
 - Wenn $X_i < 3$ OD Einheiten, dann X berechnet = X_i

- Wenn $X_i > 3$ OD Einheiten, dann X berechnet = $(Y_i - B)/A$
- Die Kalibrationskurve wird unter Verwendung einer 4 Parameter logistischen Kurve erstellt.
- Die TNF-α -Konzentration in den Proben wird durch Interpolation auf der Kalibrationskurve bestimmt.

B. Bichromatische Auswertung:

- Werten Sie die Platte bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) aus.
- Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
- 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.
- Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Kalibrationskurve.
- 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 -ELISA		OD Einheiten
		Polychromatisches Modell
Kalibrator	0 pg/ml	0,045
	6,8 pg/ml	0,120
	18 pg/ml	0,259
	52 pg/ml	0,619
	176 pg/ml	1,435
	518 pg/ml	3,237

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-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 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	Zugeg. 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. Konzent. (pg/ml)	Gemess. Konzent. (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 HCl, Bei Kontakt gründlich mit Wasser spülen.

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

XVII. LITERATUR

- 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 18 - 25°C 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 18 - 25°C unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren. Inhalt jedes Wells absaugen. Dreimal mit 400 µl Waschlösung waschen und absaugen.		
chromogene Lösung	100	100
30 min. bei 18 - 25°C unter ständigem Schütteln bei 700 rpm inkubieren.		
Stopplösung	100	100
Auf einem Mikrotiterplatten-Lesegerät auswerten und Absorption jedes Wells bei 450 nm (gg. 630 oder 650 nm) und 490 nm (gg. 630 oder 650 nm) vermerken.		

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

TNF- α -ELISA

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 ELISA 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).

DIAsource TNF- α -ELISA è un immunosaggio a sensibilità amplificata a fase solida eseguito su piastre di microtitolazione. Il dosaggio utilizza anticorpi monoclonali (Mabs) diretti contro epitopi distinti del TNF- α . I calibratori e i campioni reagiscono con la cattura dell'anticorpo monoclonale (Mab 1) che riveste il pozzetto di microtitolazione e con un anticorpo monoclonale (Mab 2) marcato con horseradish perossidasi (HRP). Dopo un periodo di incubazione che consenta la formazione di un sandwich: Mab 1 di rivestimento -TNF- α umana - Mab 2 - HRP, la piastra di microtitolazione viene lavata per rimuovere l'anticorpo marcato con enzima non legato. L'anticorpo marcato con enzima non legato viene misurato attraverso una reazione cromogena. Si procede quindi con l'aggiunta della soluzione cromogena (TMB) e successiva incubazione. La reazione viene interrotta con l'aggiunta di Soluzione di arresto; quindi la piastra di microtitolazione viene letta alla lunghezza d'onda adeguata. La quantità di turnover del substrato viene determinata colorimetricamente misurando l'assorbanza che è proporzionale alla concentrazione di TNF- α .

Viene tracciata una curva di calibrazione e la concentrazione TNF- α nei campioni viene determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione. L'utilizzo del lettore ELISA (linearità fino a 3 unità OD) associato all'impiego di un sofisticato metodo di riduzione dati (riduzione dati policromatica) garantisce un'elevata sensibilità nel range basso dei valori e un esteso range di calibrazione.

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			
<table border="1" data-bbox="76 958 263 996"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Coniugato: anti- TNF- α (anticorpi monoclonali) marcato con HRP in tampone TRIS-maleato con albumina di siero bovino e timolo	Ab	HRP	CONC	1 flacone 0,75 ml	Rosso	Aggiungere il tampone del coniugato (vedi paragrafo VII)
Ab	HRP	CONC				
<table border="1" data-bbox="108 1115 247 1153"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Calibratore Zero: plasma umano con benzamidina e timolo	CAL	0	2 flaconi liofiliz	Giallo	Aggiungere acqua distillata (vedi etichetta per volume esatto)	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="76 1220 215 1258"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibratore N= 1-5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi) in plasma umano con benzamidina e timolo.	CAL	N	5 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 2 ml di acqua distillata	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="95 1393 263 1431"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Tampone del coniugato: tampone TRIS-maleato con albumina di siero bovino, EDTA e timolo.	CONJ	BUF	1 flacone 6 ml	Rosso	Pronte per l'uso	
CONJ	BUF					
<table border="1" data-bbox="108 1534 263 1572"> <tr> <td>INC</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Tampone di incubazione: tampone TRIS-maleato con albumina di siero bovino, EDTA e timolo	INC	BUF	1 flacone 6 ml	Nero	Pronte per l'uso	
INC	BUF					
<table border="1" data-bbox="76 1684 263 1722"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacone 10 ml	Bruno	Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="87 1767 247 1805"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano e timolo	CONTROL	N	2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 2 ml di acqua distillata	
CONTROL	N					
<table border="1" data-bbox="87 1886 263 1924"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> </tr> </table> Soluzione Cromogena TMB (tetrametilbenzidina)	CHROM	TMB	1 flacone 12 ml	Bruno	Pronte per l'uso	
CHROM	TMB					
<table border="1" data-bbox="95 1982 247 2020"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Soluzione di arresto: HCl 1.0N	STOP	SOLN	1 flacone 12 ml	Bianco	Pronto per l'uso	
STOP	SOLN					

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

VI. REATTIVI NON FORNITI

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

1. Acqua distillata di qualità elevata
2. Pipette per dispensare 50 μ l, 200 μ l, 1 ml e 10 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Agitatore tipo vortex.
4. Agitatore magnetico.
5. Agitatore orizzontale per micropiastre da 700 \pm 100 rpm
6. lavatrice per piastra di microtitolazione
7. Lettore di micropiastre per letture a 450, 490 e 650 nm (in caso di lettura policromatica) o per letture a 450 e 650 nm (in caso di lettura bicromatica).

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.

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-scongelo dei campioni.
- La soluzione di lavaggio concentrata è stabile a 18 - 25°C fino alla data di scadenza.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il coniugato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

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-scongelo dei campioni.
- Prima dell'impiego, tutti i campioni devono essere a 18 - 25°C. Si raccomanda di vortexare i campioni prima di utilizzarli.
- Le condizioni di raccolta possono influenzare i valori. Adottare pertanto le massime precauzioni durante la raccolta per evitare che eventuali impurità contenute nei campioni possano stimolare la produzione di TNF- α da parte delle cellule ematiche con conseguente aumento falsato dei livelli sierici di TNF- α .

- Le provette di raccolta devono essere apirogene.

- * 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 $X_i < 3$ unità OD, X calcolato = Xi
- * Se $X_i > 3$ unità OD, X calcolato = $(Y_i - B) / A$
- * Per tracciare la curva di calibrazione viene utilizzato un modello di adattamento della curva logistica a 4 parametri.
- * La concentrazione di TNF- α nel campione viene determinata per interpolazione sulla curva di calibrazione.

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 18 - 25°C.
 Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione.
 Eseguire calibratori, controlli e campioni in doppio. Si raccomanda l'allineamento verticale.
 Utilizzare un contenitore di plastica pulito per preparare la soluzione di lavaggio.
 Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.
 Per la distribuzione della Soluzione di Rivelazione e la Soluzione di arresto evitare pipette con parti metalliche.
 L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio.
 Rispettare i tempi di incubazione.
 Per evitare derive, l'intervallo tra il pipettaggio del primo calibratore e l'ultimo campione deve essere limitato ai tempi riportati nella sezione 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 μ l di Tampone di Incubazione in ogni pozzetto
- Pipettare 200 μ l di ogni calibratore, controllo e campione nei pozzetti adeguati.
- Incubare per 2 ore a 18 - 25°C su agitatore orizzontale regolato a 700 \pm 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 μ l del calibratore zero in tutti i pozzetti.
- Pipettare 50 μ l di coniugato anti- TNF- α -HRP in tutti i pozzetti.
- Incubare per 2 ore a 18 - 25°C su agitatore orizzontale regolato a 700 \pm 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 μ l 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 15 minuti a 18 - 25°C su un agitatore orizzontale a 700 \pm 100 rpm; evitare la luce diretta del sole.
- Pipettare 100 μ l 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 30 minuti 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.
- 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 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:

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

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

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI RECUPERO

Campione	TNF- 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

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

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

Evitare qualsiasi contatto della cute con tutti i reagenti, la Soluzione di Arresto contiene HCl.

In caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua.

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

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.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. BEUTLER B., CERAMI A. (1987)
Cachectin : more than a tumor necrosis factor.
N. Engl. J. Med., 316 ; 379-385.
2. TRACEY K.J., FONG Y., HESSE D.G., MANOGUE K.R., LEE A.T., KUO G.C., LOWRY S.F. and CERAMI A. (1987)
Anti cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia.
Nature, 330 : 662-664.
3. PIGUET P.F., GRAU G.E., ALLET B. and VASSALLI P. (1987)
Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-versus-host disease.
J. Exp. Med., 166 ; 1280-1289.
4. AUKRUST P., LIABAKK N-B., MÜLLER F., LIEN E., ESPEVIK T. and FROLAND S.S. (1994)
Serum Levels of Tumor Necrosis Factor- 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. 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 18 - 25°C in agitazione continua a 700 rpm. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 400 μ l di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Calibratore Zero	100	100
Coniugato Anti-TNF- α - HRP	50	50
Incubare per 2 ore a 18 - 25°C in agitazione continua a 700 rpm. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 400 μ l di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Soluzione cromogenica	100	100
Incubare per 15 minuti a 18 - 25°C in agitazione continua a 700 rpm.		
Soluzione di arresto	100	100
Leggere su un lettore per piastra da microtitolazione e registrare l'assorbanza di ogni pozzetto a 450 nm (e 490 nm) rispetto a 630 (o 650 nm)		



Lea todo el protocolo antes de usar.

TNF- α -ELISA

I. INDICACIONES

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

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre comercial:** Kit de TNF- α -ELISA de DIAsource
- B. **Número de catálogo:** KAP1751: 96 pruebas
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para recibir asistencia técnica o información sobre pedidos póngase en contacto con:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. ANTECEDENTES CLÍNICOS

A. Actividades biológicas

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

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


B. Aplicación clínica

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

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El TNF- α -ELISA de DÍAsource es un inmunoensayo enzimático de sensibilidad amplificada en fase sólida que se realiza en placa de microvaloración. El ensayo utiliza anticuerpos monoclonales (AcM) dirigidos contra distintos epítomos del TNF- α . Los calibradores y las muestras reaccionan con el anticuerpo monoclonal de captura (AcM 1) que recubre el pocillo de microvaloración y con un anticuerpo monoclonal (AcM 2) marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Tras un período de incubación que permite la formación de un sándwich: AcM 1 recubierto – TNF- α humana – AcM 2 – HRP, se lava la placa de microvaloración para eliminar el anticuerpo marcado con enzimas no unidas. El anticuerpo marcado con enzimas unidas se mide a través de una reacción cromogénica. Se añade la solución cromogénica (TMB) y se incuba. Se detiene la reacción añadiendo solución de parada y a continuación se lee la placa de microvaloración a la longitud de onda adecuada. La cantidad de sustrato transformado se determina colorimétricamente midiendo la absorbancia, que es proporcional a la concentración de TNF- α . Se representa una curva de calibración y se determina la concentración de TNF- α de las muestras mediante interpolación en la curva de calibración. El uso del lector ELISA (linealidad de hasta 3 unidades de DO) y de un método sofisticado de reducción de datos (reducción de datos policromáticos) da lugar a una sensibilidad alta en el intervalo bajo y a un intervalo de calibración extendido.

V. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Reactivos	Kit de 96 pruebas	Código de color	Reconstitución			
 Placa de microvaloración de 96 pocillos recubiertos con anti- TNF- α	96 pocillos	azul	Listo para usar			
<table border="1" data-bbox="71 952 263 985"><tr><td>Ab</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table> Conjugado: HRP marcado anti TNF- α (anticuerpos monoclonales) en tampón de maleato-TRIS con albúmina de suero bovino y timol	Ab	HRP	CONC	1 vial 0,75 ml	rojo	Añadir tampón de conjugado (consultar la sección VII)
Ab	HRP	CONC				
<table border="1" data-bbox="111 1108 231 1142"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrador cero en plasma humano, benzamidina y timol	CAL	0	2 viales liofil.	amarillo	Añadir agua destilada (véase en la etiqueta el volumen exacto)	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="103 1220 231 1254"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrador N = 1 a 5 (véanse los valores exactos en las etiquetas del vial) en suero humano, benzamidina y timol	CAL	N	5 viales liofil.	amarillo	Añadir 2 ml de agua destilada	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="87 1377 247 1411"><tr><td>CONJ</td><td>BUF</td></tr></table> Tampón del conjugado: Tampón de maleato-TRIS con albúmina de suero bovino, EDTA y timol	CONJ	BUF	1 vial 6 ml	rojo	Listo para usar	
CONJ	BUF					
<table border="1" data-bbox="87 1523 247 1556"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Tampón de incubación: Tampón de maleato-TRIS con albúmina de suero bovino, EDTA y timol	INC	BUF	1 vial 6 ml	negro	Listo para usar	
INC	BUF					
<table border="1" data-bbox="103 1668 279 1702"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solución de lavado (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 200 x con agua destilada (usar un agitador magnético).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="103 1780 263 1814"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controles - N = 1 o 2 en plasma humano y timol	CONTROL	N	2 viales liofil.	plata	Añadir 2 ml de agua destilada	
CONTROL	N					
<table border="1" data-bbox="71 1892 311 1926"><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table> TMB cromogénica (tetrametilbencidina)	CHROM	TMB	1 vial 12 ml	marrón	Listo para usar	
CHROM	TMB					
<table border="1" data-bbox="87 1982 279 2016"><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> Solución de parada: HCl 1,0N	STOP	SOLN	1 vial 12 ml	blanco	Listo para usar	
STOP	SOLN					

Nota: 1. Para diluciones de muestras utilizar el calibrador cero.

2. 1 pg de la preparación del calibrador es equivalente a 40 mIU del estándar internacional 87/650 del NIBSC.

VI. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

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

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

VII. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- A. **Calibradores:** Reconstituya el calibrador cero al volumen especificado en la etiqueta del vial con agua destilada y los otros calibradores con 2 ml de agua destilada.
- B. **Controles:** reconstituya los controles con 2 ml de agua destilada.
- C. **Solución de conjugado:** después de la cantidad de pocillos a utilizar, diluya el conjugado concentrado con el tampón de conjugado en un vial de vidrio limpio: consulte la tabla que aparece a continuación para ver los volúmenes a pipetear. Se recomienda preparar en el momento de usar. El conjugado diluido es estable durante un máx. de 1 semana en 2-8°C.

TABLA DE LA DILUCIÓN DEL CONJUGADO

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

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

VIII. CONSERVACIÓN Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

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

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- El suero debe eliminarse lo antes posible del coágulo de hemáties tras la coagulación y centrifugación, y conservarse a 4°C. Si las muestras no se utilizan inmediatamente, deben conservarse a -20 °C durante un máximo de 2 meses, y a -70 °C para períodos más largos (máximo un año).
- Evite ciclos posteriores de congelación y descongelación.
- Antes de su uso, todas las muestras deben estar a 18- 25°C. Se recomienda agitar las muestras en un vórtex antes de su uso.

- Las condiciones de obtención de las muestras pueden influir en los valores; por tanto; deben tomarse estrictas precauciones durante su recogida para evitar impurezas contenidas en los materiales de obtención de las muestras que estimulen la producción de TNF- α por las células sanguíneas y aumentar así incorrectamente los valores de TNF- α en suero.
- Los tubos de recogida deben ser apirógenos.

X. PROCEDIMIENTO

A. Notas sobre la manipulación

No utilice el kit o sus componentes pasada la fecha de caducidad.
No mezcle materiales de distintos lotes de kit.
Todos los reactivos deben estar a 18- 25 °C antes de usarse.
Mezcle bien todos los reactivos y muestras agitándolos o revolviéndolos suavemente.
Realice los calibradores, los controles y las muestras por duplicado. Se recomienda alinear verticalmente.
Utilice un recipiente de plástico limpio para preparar la solución de lavado.
Para evitar la contaminación cruzada, utilice una punta de pipeta desechable al añadir cada reactivo y muestra.
No utilice pipetas con partes metálicas para dispensar la solución de revelación y la solución de parada.
Las pipetas de alta precisión o un equipo de pipeteo automatizado mejorarán la precisión.
Respete los tiempos de incubación.
Para que no haya desvíos, el tiempo entre el pipeteo del primer calibrador y la última muestra debe limitarse al tiempo indicado en el apartado XIII, párrafo E (Tiempo de demora).
Prepare una curva de calibración para cada análisis, no utilice datos de análisis anteriores.
La solución de revelación debe ser incolora. Si unos minutos después de la preparación se vuelve azul, indica que el reactivo no se puede usar y se debe desechar.
Dispense la solución de revelación antes de transcurridos 15 minutos desde el lavado de la placa de microvaloración.
Durante la incubación con solución de revelación, evite la luz solar directa en la placa de microvaloración.

B. Procedimiento

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

XI. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

A. Lectura policromática

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

- Se emplea un ajuste de la curva logística de 4 parámetros para generar la curva de calibración.
- La concentración de TNF-α de las muestras se determina mediante interpolación en la curva de calibración.

B. Lectura bicromática

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

XII. DATOS TÍPICOS

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

TNF-α-ELISA		Modelo policromático de unidades de DO
Calibrador	0 pg/ml	0,045
	6,8 pg/ml	0,120
	18 pg/ml	0,259
	52 pg/ml	0,619
	176 pg/ml	1,435
	518 pg/ml	3,237

XIII. EFICACIA Y LIMITACIONES

A. Límite de detección

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

B. Especificidad

No se observó ninguna reacción cruzada significativa en presencia de 50 ng de 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 y RANTES. Este ensayo de TNF-α es específico para TNF-α humano natural y recombinante.

C. Precisión

INTRAENSAYO				INTERENSAYO			
Suero	N	<X> ± DE (pg/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> ± DE (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

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

D. Exactitud

PRUEBA DE RECUPERACIÓN

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

PRUEBA DE DILUCIÓN

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

Las muestras se diluyeron con el calibrador cero.

E. Tiempo de demora entre el último calibrador y la dispensación de la muestra

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

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

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el control 1 o el control 2 no se encuentran dentro del intervalo especificado en la etiqueta del vial, no se pueden utilizar dichos resultados, salvo que se proporcione una explicación satisfactoria sobre la discrepancia.
- Cada laboratorio puede, si lo desea, realizar sus propias mezclas de muestras control, que deberían conservarse congeladas en alícuotas. Los controles que contienen azida interferirán con la reacción enzimática por lo que no se pueden utilizar.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados duplicados de las muestras deben basarse en las Buenas Prácticas de Laboratorio.
- Se recomienda analizar los controles de forma rutinaria como muestras desconocidas para medir la variabilidad del ensayo. La eficacia del ensayo debe monitorizarse con gráficas de control de calidad de los controles.
- Es una buena práctica comprobar visualmente el ajuste de la curva seleccionada por el ordenador.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

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

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

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Solo para uso diagnóstico *in vitro*.

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

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

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

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

XVII. BIBLIOGRAFÍA

- 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. RESUMEN DEL PROTOCOLO

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



Leia todo o protocolo antes de usar.

TNF- α -ELISA

I. USO PREVISTO

Ensaio imunoenzimático para a doseamento quantitativo in vitro do Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) humano no soro.

II. INFORMAÇÕES GERAIS

- A. **Nome proprietário:** Kit DIAsource TNF- α -ELISA
- B. **Catálogo de número:** KAP1751: 96 testes
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays SA
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

**Para assistência técnica ou informações sobre pedidos,
contate: Tel: +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91**

III. CONTEXTO CLÍNICO

A. Atividade biológica

O Fator de Necrose Tumoral Humana Alfa (TNF- α), também denominado caquectina, é uma citocina polipeptídica não glicosilada de 157 AA, produzida principalmente por macrófagos ativados (monócitos). O lipopolissacarídeo (LPS), componente da parede celular de bactérias gram-negativas (endotoxina), é um potente estímulo para a produção de TNF- α por macrófagos e o TNF- α é um importante mediador dos efeitos in vivo bem conhecidos do LPS, como necrose hemorrágica tumoral, febre, choque e ativação de neutrófilos. As várias atividades biológicas do TNF- α podem ser classificadas como:

- *Atividades antitumorais e reguladoras do crescimento:* o TNF- α apresenta uma toxicidade seletiva para células tumorais e infectadas por vírus. Por outro lado, é angiogénico e estimula o crescimento de fibroblastos cultivados.
- *Atividades imunomoduladoras e pró-inflamatórias:* o TNF- α ativa macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, bem como células endoteliais (que apresentam atividade pró-coagulante). Regula a produção de anticorpos pelas células B e estimula as células T citotóxicas. Induz a produção de vários outros mediadores inflamatórios como IL-1, IL-6, fatores estimuladores de colónias, prostaglandinas, fator ativador de plaquetas (PAF), collagenases, etc.
- *Atividades metabólicas:* o TNF- α inibe fortemente a lipoproteína lipase e a expressão génica de adipócitos.

B. Aplicação clínica

O TNF- α tem um papel patogénico importante: na caquexia associada a doenças infecciosas ou cancerígenas crónicas; no choque séptico onde a neutralização do TNF- α protege contra a letalidade aguda associada; na rejeição do enxerto e na doença do enxerto contra o hospedeiro; e em infeções parasitárias onde o TNF- α pode fornecer alguma proteção, mas também favorece formas mais graves da doença (por exemplo, a forma cerebral da malária). O TNF- α , muitas vezes em combinação com outras citocinas, também está envolvido em várias doenças autoimunes e até mesmo na patogénese da arteriosclerose. Níveis altos anormais de TNF- α sérico foram descritos em choque séptico, rejeição de enxerto, infeções parasitárias, cancro, pós-hemofiltrações, durante terapia in vivo com citocina (IL-2), etc. Além de uma visão sobre a patogénese, essas determinações podem fornecer uma ajuda no diagnóstico (ex. infeções sistémicas).

IV. PRINCÍPIO DO MÉTODO


O TNF- α -ELISA DIASource é um imunoenensaio enzimático de sensibilidade amplificada em fase sólida que se realiza em microplaca. O ensaio utiliza anticorpos monoclonais (MAbs) direcionados contra epítopos distintos de TNF- α .

Os calibradores e as amostras reagem com o anticorpo monoclonal de captura (MAB 1) que reveste o poço de microtitulação e com um anticorpo monoclonal (MAB 2) marcado com peroxidase de rábano (HRP). Após um período de incubação forma-se uma sanduíche: MAB 1 revestido – TNF- α humano – MAB 2 – HRP, a microplaca é lavada para remover o anticorpo marcado com enzima não ligado. O anticorpo marcado com enzima é medido através de uma reação cromogénica.

A solução cromogénica (TMB) é adicionada e incubada. A reação é interrompida com a adição de solução de stop e a microplaca é então lida no comprimento de onda apropriado.

Uma curva de calibração é traçada e a concentração de TNF- α nas amostras é determinada por interpolação da curva de calibração. O uso do leitor ELISA (linearidade de até 3 unidades OD) e um método sofisticado de redução de dados (redução policromática de dados) resulta numa alta sensibilidade na faixa baixa e na faixa de calibração estendida.

V. REAGENTES FORNECIDOS

Reagentes	96 kits de testes	Reconstituição			
 Microplaca com 96 poços revestidos anti TNF- α (anticorpos monoclonais)	96 poços	Pronto para uso			
<table border="1" data-bbox="71 851 303 884"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> <p>Conjugado: anti-TNF-α marcado com HRP (anticorpos monoclonais) em tampão TRIS-Maleato com albumina de soro bovino e timol</p>	Ab	HRP	CONC	1 frasco 0,75 ml	Adicionar tampão conjugado (ver seção VII)
Ab	HRP	CONC			
<table border="1" data-bbox="119 1019 271 1052"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> <p>Calibrador zero em plasma humano, benzamida e timol</p>	CAL	0	2 frascos liofilizado.	Adicionar água destilada (veja no rótulo o volume exato).	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="103 1153 239 1187"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Calibrador N = 1 a 5 (ver valores exatos nos rótulos dos frascos) em plasma humano, benzamida e timol</p>	CAL	N	5 frascos liofilizado.	Adicionar 2 ml de água destilada	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="87 1288 263 1321"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> </tr> </table> <p>Tampão conjugado: Tampão TRIS-Maleato com albumina de soro bovino, EDTA e timol</p>	CONJ	BUF	1 frasco 6ml	Pronto para uso	
CONJ	BUF				
<table border="1" data-bbox="87 1433 263 1467"> <tr> <td>INC</td> <td>BUF</td> </tr> </table> <p>Tampão de incubação: Tampão TRIS-Maleato com albumina de soro bovino, EDTA e timol</p>	INC	BUF	1 frasco 6ml	Pronto para uso	
INC	BUF				
<table border="1" data-bbox="95 1579 295 1612"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> <p>Solução de Lavagem (Tris-HCl)</p>	WASH	SOLN	CONC	1 frasco 10 ml	Diluir 200 x com água destilada (use um agitador magnético).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="103 1680 271 1713"> <tr> <td>CONTRO</td> <td>LEN</td> </tr> </table> <p>Controlos - N = 1 ou 2 em plasma humano e timol</p>	CONTRO	LEN	2 frascos liofilizado.	Adicionar 2 ml de água destilada	
CONTRO	LEN				
<table border="1" data-bbox="71 1780 359 1814"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> </tr> </table> <p>Cromogénio TMB (Tetrametilbenzidina)</p>	CHROM	TMB	1 frasco 12ml	Pronto para uso	
CHROM	TMB				
<table border="1" data-bbox="79 1892 279 1926"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> <p>Solução de Stop: HCl 1,0 N</p>	STOP	SOLN	1 frasco 12ml	Pronto para uso	
STOP	SOLN				

Observação: 1. Use o calibrador zero para diluições de amostra.

2. 1pg da preparação do calibrador é equivalente a 40 mIU do NIBSC IS 87/650.

VI. MATERIAL NÃO FORNECIDO

O seguinte material é necessário, mas não fornecido no kit:

1. Água destilada de alta qualidade
2. Pipetas para medição de: 50 μ l, 200 μ l, 1 ml e 10 ml (recomenda-se o uso de pipetas precisas com pontas de plástico descartáveis)
3. Agitador Vortex
4. Agitador magnético
5. Agitador horizontal de placas de microtitulação que atinja 700 rpm \pm 100 rpm
6. Lavador para placas de microtitulação
7. Leitor de microplacas capaz de ler em 450 nm, 490 nm e 650 nm (leitura policromática) ou capaz de ler em 450 nm e 650 nm (leitura bicromática)

VII. PREPARAÇÃO DE REAGENTES

A. **Calibradores:** Reconstitua o calibrador zero com o volume especificado no rótulo do frasco com água destilada e os outros calibradores com 2 ml de água destilada.

B. **Controlos:** Reconstitua os controlos com 2 ml de água destilada.

C. **Solução de conjugado:** de acordo com o número de poços a serem usados, dilua o conjugado concentrado com o tampão de conjugado num frasco de vidro limpo: veja a tabela abaixo para os volumes a pipetar. A preparação extemporânea é recomendada. O conjugado diluído é estável por no máx. 1 semana a 2-8 C.

□ TABELA DILUIÇÃO DO CONJUGADO

Número de poços	Conjugado concentrado	Tampão conjugado	volume de trabalho
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. **Solução de lavagem de trabalho:** Prepare um volume adequado de solução de lavagem de trabalho adicionando 199 volumes de água destilada a 1 volume de solução de lavagem (200x). Use um agitador magnético para homogeneizar. Descarte a solução de lavagem de trabalho não utilizada no final do dia.

VIII. ARMAZENAMENTO E DATA DE VALIDADE DOS REAGENTES

- Antes da abertura ou reconstituição, todos os componentes do kit são estáveis até a data de validade indicada no rótulo do frasco, desde que mantidos entre 2 e 8°C.
- As tiras dos poços não utilizadas devem ser armazenadas, a 2-8°C, num saco selado contendo um dessecante até a data de validade.
- Após a reconstituição, os calibradores e controlos são estáveis por 4 dias entre 2 e 8°C. Para períodos de armazenamento mais longos, as alíquotas devem ser mantidas a -20°C por no máximo 2 meses. Evite ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento.
- A solução de lavagem concentrada é estável entre 18 e 25°C até à data de validade.
- A solução de lavagem de trabalho recém-preparada deve ser usada no mesmo dia.
- Após a primeira utilização, o conjugado é estável até ao prazo de validade, desde que mantido no frasco original bem fechado entre 2 e 8°C.
- Alterações na aparência física dos reagentes do kit podem indicar instabilidade ou deterioração.

IX. COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

- Após a formação do coágulo, a amostra deve ser centrifugada e o soro deve ser removido o mais rápido possível, e mantido a 4 ° C. Se as amostras não forem usadas imediatamente, devem ser congeladas a -20° C por no máximo 2 meses e a -70°C para armazenamento mais longo (máximo um ano).
- Evite ciclos repetidos de congelamento e descongelamento.
- Antes de iniciar o doseamento todas as amostras devem estar entre 18 e 25°C. Recomenda-se agitar as amostras antes do uso.
- As condições da colheita podem afetar os valores, portanto, devem ser tomadas precauções durante a colheita e preparação das amostras para evitar que as impurezas contidas nos materiais de colheita que possam estimular a produção de IL-1 β pelas células sanguíneas e, assim, aumentar falsamente os valores plasmáticos de IL-1 β .
- Os tubos de colheita devem ser isentos de pirogénicos. O plasma pode ser colhido em EDTA estéril e rapidamente separado após a centrifugação. O uso de tubos de heparina é desencorajado, pois os lotes de heparina estão frequentemente contaminados com pirogénico.

X. PROCEDIMENTO

A. Notas de manuseamento

Não use o kit ou componentes do mesmo fora do prazo e validade. Não misture materiais de diferentes lotes de kits. Permita que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente (18-25°C) antes de usar. Misture bem todos os reagentes e amostras agitando ou girando suavemente.

Dosei os calibradores, controlos e amostras em duplicado.

O alinhamento vertical é recomendado.

Use um recipiente de plástico limpo para preparar a solução de lavagem. Para evitar a contaminação cruzada, use uma ponta de pipeta descartável limpa para a adição de cada reagente e amostra.

Para dispensar a solução cromogénica e a solução de stop, evite usar pipetas com partes metálicas.

Pipetas de alta precisão ou equipamentos de pipetagem automatizados melhoram a precisão. Respeite os tempos de incubação.

Para evitar desvios nos resultados, o tempo entre a pipetagem do primeiro calibrador e a última amostra deve ser limitado ao tempo mencionado na seção XIII parágrafo E (tempo de pipetagem).

Prepare uma curva de calibração para cada doseamento, não use dados de doseamentos anteriores.

A solução cromogénica deve ser incolor. Se uma cor azul se desenvolver dentro de alguns minutos após a preparação, isso indica que o reagente não pode ser usado e deve ser eliminado.

Dispense a solução cromogénica antes de transcorridos 15 minutos após a lavagem da microplaca.

Durante a incubação com solução cromogénica, evite a luz solar direta na placa

B. Procedimento

1. Selecione o número necessário de tiras para o doseamento. As tiras não utilizadas devem ser seladas no saco com um exsiccante e armazenadas entre 2-8°C.
2. Prenda as tiras na estrutura de suporte.
3. Pipetar 50 µl de tampão de incubação em todos os poços
4. Pipete 200 µl de cada calibrador, controlo e amostra nos poços apropriados.
5. Incubar durante 2 horas a 18 - 25°C num agitador horizontal regulado para 700 rpm ± 100 rpm.
6. Aspirar o líquido de cada poço.
7. Lave a placa 3 vezes:
 - Dispensar 0,4 ml de Solução de Lavagem em cada poço
 - Aspirar o conteúdo de cada poço
8. Pipetar 100 µl de calibrador zero em todos os poços
9. Pipetar 50 µl de conjugado anti-TNF-α-HRP em todos os poços.
10. Incubar durante 2 horas a 18 - 25°C num agitador horizontal regulado para 700 rpm ± 100 rpm.
11. Aspirar o líquido de cada poço.
12. Lave a placa 3 vezes:
 - Dispensar 0,4 ml de Solução de Lavagem em cada poço
 - Aspirando o conteúdo de cada poço
13. Pipete 100 µl da Solução Cromogénica em cada poço dentro de 15 minutos após a etapa de lavagem.
14. Incube a placa de microtitulação por 15 minutos a 18 - 25°C num agitador horizontal regulado para 700 rpm ± 100 rpm, evite a luz solar direta.
15. Pipete 100 µl de solução Stop em cada poço.
16. Leia as absorvências a 450 nm e 490 nm (filtro de referência 630 nm ou 650 nm) em 30 minutos e calcule os resultados conforme descrito na seção XI.

XI. CÁLCULO DE RESULTADOS

A. Leitura Policromática:

1. Neste caso, o software fará o processamento dos dados.
2. A placa é lida primeiro a 450 nm contra um filtro de referência definido para 650 nm (ou 630 nm).
3. Uma segunda leitura é realizada a 490 nm contra o mesmo filtro de referência.
4. O Software controlará o leitor automaticamente e integrará ambas as leituras num modelo policromático. Esta técnica pode gerar ODs de até 10.
5. O princípio do processamento de dados policromáticos é o seguinte:
 - $X_i = OD$ a 450 nm
 - $Y_i = OD$ a 490 nm
 - Usando uma regressão linear não ponderada standard, os parâmetros A e B são calculados: $Y = A \cdot X + B$
 - Se $X_i < 3$ unidades OD, então X calculado = X_i
 - Se $X_i > 3$ unidades OD, então X calculado = $(Y_i - B)/A$
 - Para construir a curva de calibração utilize a função 4 parâmetros logística.

- A concentração de TNF-α nas amostras é determinada por interpolação na curva de calibração.

B. Leitura bicromática

1. Leia a placa a 450 nm contra um filtro de referência definido para 650 nm (ou 630 nm).
2. Calcule a média dos duplicados.
3. Em papel semi-logarítmico ou linear, coloque os valores de OD (ordenadas) para cada calibrador em relação à concentração correspondente de TNF-α (abscissa) e desenhe uma curva de calibração através dos pontos do calibrador conectando os pontos traçados com linhas retas.
4. Leia a concentração para cada controlo e amostra por interpolação na curva de calibração.
5. A redução de dados assistida por computador simplifica estes cálculos. Se o processamento automático de resultados for usado, recomenda-se um ajuste de curva usando a função 4 parâmetros logística

XII. CURVA PADRÃO

Os dados a seguir são apenas para ilustração e nunca devem ser usados para substituir os dados da curva de calibração em tempo real.

TNF- α -ELISA		Unidades OD Modelo policromático
calibrador	0 pg/ml	0,045
	6,8 pg/ml	0,120
	18 pg/ml	0,259
	52 pg/ml	0,619
	176 pg/ml	1,435
	518 pg/ml	3,237

XIII. DESEMPENHO E LIMITAÇÕES

A. Limite de deteção

Foram testados vinte calibradores zero juntamente com um conjunto de outros calibradores. O limite de deteção, definido como a concentração dois desvios padrão acima da DO média do standard zero, foi de 0,7 pg/ml.

B. Especificidade

Não foi observada nenhuma reação cruzada significativa na presença de 50 ng de IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TNF- β , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TGF- β , GM-CSF, OSM, MIP-1 α , MIP-1 β , LIF, MCP-1, G-CSF e RANTES. Este ensaio de TNF- α é específico para TNF- α humano natural e recombinante.

C. Precisão

ENSAIO INTRA				INTER ENSAIO			
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: Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação

D. Precisão

TESTE DE RECUPERAÇÃO

Amostra	Adicionado TNF- α (pg/ml)	TNF- α recuperado (pg/ml)	Recuperação (%)
Soro 1	0	6,2	-
	38,4	43,3	97
	83,9	90,0	100
	188,3	192,5	99
	408,2	376,2	91
Soro 2	0	3,8	-
	38,4	45,5	108
	83,9	91,2	104
	188,3	162,2	84
	408,2	379,2	92

TESTE DE DILUIÇÃO

Amostra	Diluição	CONCENTRAÇÃO TEÓRICA (pg/ml)	Concentração medida (pg/ml)
Soro 1	1	-	436,5
	2	218,3	212,4
	4	109,1	104,8
	8	54,6	59,5
	16	27,3	31,7
Soro 2	1	-	420,2
	2	210,1	211,2
	4	105,0	98
	8	52,5	58,3
	16	26,3	30,7

As amostras foram diluídas com calibrador zero.

E. Tempo entre pipetagem do último calibrador e a amostra

Conforme mostrado a seguir, os resultados do ensaio permanecem precisos mesmo quando uma amostra é dispensada 30 minutos após os calibradores terem sido adicionados aos poços revestidos.

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

XIV. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

- Se os resultados obtidos para o Controle 1 e/ou Controle 2 não estiverem dentro do intervalo especificado no rótulo do frasco, os resultados não podem ser usados a menos que tenha sido fornecida uma explicação satisfatória para a discrepância.
- Se desejar, cada laboratório pode fazer seus próprios pools de amostras de controlo, que devem ser mantidas congeladas em alíquotas. Os controlos que contêm azida interferem na reação enzimática e não podem ser usados.
- Os critérios de aceitação para a diferença entre os resultados duplicados das amostras devem basear-se nas Boas Práticas de Laboratório
- Recomenda-se que os controlos sejam analisados rotineiramente como amostras desconhecidas para medir a variabilidade do ensaio. O desempenho do ensaio deve ser monitorizado com gráficos de controlo de qualidade.
- É uma boa prática verificar visualmente o ajuste da curva selecionado pelo computador.

XV. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Estes valores são fornecidos apenas para orientação; cada laboratório deve estabelecer sua própria faixa normalidade.

Para orientação, os resultados de 30 amostras de soro de indivíduos aparentemente saudáveis com baixos níveis de PCR variaram entre 4,6 e 12,4 pg/ml.

XVI. PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

Segurança

Apenas para uso em diagnóstico in vitro.

Os componentes do sangue humano incluídos neste kit foram testados por métodos europeus aprovados e/ou aprovados pela FDA e resultaram negativos para HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 e 2. Nenhum método conhecido pode oferecer garantia total de que os derivados do sangue humano não transmitem hepatite, HIV ou outras infeções. Portanto, o manuseamento de reagentes, amostras de soro ou plasma deve estar de acordo com os procedimentos de segurança locais.

Todos os produtos e derivados de origem animal foram colhidos de animais saudáveis. Os componentes bovinos são originários de países onde a BSE não foi notificada. No entanto, os componentes que contêm substâncias de origem animal devem ser tratados como potencialmente infecciosos.

Evite qualquer contacto da pele com todos os reagentes, a solução de stop contém HCl. Em caso de contacto, lave abundantemente com água.

Não fume, beba, coma ou aplique cosméticos na área de trabalho. Não pipetar com a boca. Use roupas de proteção e luvas descartáveis.

XVII. BIBLIOGRAFIA

- BEUTLER B., CERAMI A. (1987) **Caquectina: mais que um fator de necrose tumoral.** N. Engl. J. Med., 316; 379-385.
- TRACEY KJ, FONG Y., HESSE DG, MANOGUE KR, LEE AT, KUO GC, LOWRY SF e CERAMI A. (1987) **Os anticorpos monoclonais anticaquectina/TNF previnem o choque séptico durante a bacteremia letal.** Nature, 330: 662-664.
- PIGUET PF, GRAU GE, ALLET B. e VASSALLI P. (1987) **O fator de necrose tumoral/caquectina é um efetor de lesões cutâneas e intestinais da fase aguda da doença do enxerto contra o hospedeiro.** J. Exp. Med., 166; 1280-1289.
- AUKRUST P., LIABAKK NB., MÜLLER F., LIEN E., ESPEVIK T. e FROLAND SS (1994) **Níveis Séricos de Fator de Necrose Tumoral- α (TNF α) e Receptores Solúvel de TNF na Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 - Correlações com Parâmetros Clínicos Imunológicos e Viroológicos.** J. Inf. Dis., 169:420-424.
- WAAGE A., HALSTENSEN A. e ESPEVIK T. (1987) **Associação entre fator de necrose tumoral no soro e desfecho fatal em pacientes com doença meningocócica.** Lancet, 1; 355-357.
- LEROUX-ROELS G., OFFNER F., PHILIPPE J. e VERMEULEN A. (1988) **Influência dos Sistemas de Coleta de Sangue nas Concentrações do Fator de Necrose Tumoral no Soro e Plasma.** Clin. Chem., 34; 2373-2374.

XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

	CALIBRADORES (μ l)	CONTROLOS E AMOSTRA(S) (μ l)
Tampão de incubação	50	50
Calibradores (0-5)	200	-
Amostras, Controlos	-	200
Incubar durante 2 horas a 18 - 25°C com agitação contínua a 700 rpm. Aspirar o conteúdo de cada poço. Lavar 3 vezes com 400 μ l de Solução de Lavagem e aspirar.		
calibrador zero	100	100
Conjugado anti-TNF- α -HRP	50	50
Incubar durante 2 horas a 18 - 25°C com agitação contínua a 700 rpm. Aspirar o conteúdo de cada poço. Lavar 3 vezes com 400 μ l de Solução de Lavagem e aspirar.		
solução cromogénica	100	100
Incubar por 15 min a 18 - 25°C com agitação contínua a 700 rpm.		
Solução de stop	100	100
Leia num leitor de microtitulação e registre a absorbância de cada poço a 450 nm (e 490 nm) versus 630 (ou 650 nm)		

Outras traduções desta Instrução de Uso podem ser baixadas em nosso site: <https://www.diasource-diagnostics.com/>



Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

TNF- α -ELISA

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:** Kit TNF- α -ELISA 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 λιποπολυσακχαρίτες (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 ηωσινόφιλα, 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-ELISA 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 ραφινιδική υπεροξειδάση (HRP). Μετά από μια περίοδο επώασης που επιτρέπει το σχηματισμό ενός σάντουιτς: επιστρωμένο MAB 1 – ανθρώπινο 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 αναγωγή από την καμπύλη βαθμονόμησης. Η χρήση του συστήματος ανάγνωσης ELISA (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			
<table border="1" data-bbox="71 1030 263 1086"><tr><td>Ab</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table> Σύζευγμα: Αντι-TNF-α (μονοκλωνικά αντισώματα) σημασμένα με HRP σε ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-Maleate με βόεια ορολευκοματίνη και θυμόλη	Ab	HRP	CONC	1 φιαλίδιο 0,75 ml	κόκκινο	Προσθέστε ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος (βλ. ενότητα VII)
Ab	HRP	CONC				
<table border="1" data-bbox="111 1209 231 1265"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Μηδενικός βαθμονομητής σε ανθρώπινο πλάσμα, βενζαμιδίνη και θυμόλη	CAL	0	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε απεσταγμένο νερού (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων)	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="111 1355 247 1411"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Βαθμονομητής N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο πλάσμα, βενζαμιδίνη και θυμόλη	CAL	N	5 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε 2 ml απεσταγμένου νερού	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="119 1534 295 1590"><tr><td>CONJ</td><td>BUF</td></tr></table> Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος: Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-Maleate με βόεια ορολευκοματίνη, EDTA και θυμόλη	CONJ	BUF	1 φιαλίδιο 6 ml	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση	
CONJ	BUF					
<table border="1" data-bbox="119 1702 295 1758"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης: Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-Maleate με βόεια ορολευκοματίνη, EDTA και θυμόλη	INC	BUF	1 φιαλίδιο 6 ml	μαύρο	Έτοιμο για χρήση	
INC	BUF					
<table border="1" data-bbox="71 1870 263 1926"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Διάλυμα πλύσης (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 200 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="87 1982 263 2038"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο πλάσμα με θυμόλη	CONTROL	N	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	ασημί	Προσθέστε 2 ml απεσταγμένου νερού	
CONTROL	N					

CHROM	TMB	1 φιαλίδιο 12 ml	καφέ	Έτοιμο για χρήση
Χρωμογόνος TMB (τετραμεθυλβενζυδίνη)				
STOP	SOLN	1 φιαλίδιο 12 ml	λευκό	Έτοιμο για χρήση
Ανασχετικό αντιδραστήριο: HCl 1,0N				

Σημειώσεις: 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:

1. Απεσταγμένο νερό υψηλής ποιότητας
2. Πιπέτες για διανομή: 50 μl, 200 μl, 1 ml και 10 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
3. Αναμεικτής στροβιλισμού
4. Μαγνητικός αναδευτήρας
5. Οριζόντια συσκευή ανάδευσης πλακών μικροτιτλοδότησης με δυνατότητα 700 rpm ± 100 rpm
6. Συσκευή πλύσης για πλάκες μικροτιτλοδότησης
7. 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)

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε το μηδενικό βαθμονομητή στον όγκο που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου με απεσταγμένο νερό και άλλους βαθμονομητές με 2 ml απεσταγμένου νερού.
- Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 2 ml απεσταγμένου νερού.
- 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

- 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.

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 18 - 25°C 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.

- 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 φυγοκέντρωση 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 18 - 25°C πριν από τη χρήση. Συνιστάται η ανάμειξη 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 διέγειραν 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. Μη αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες kit. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε 18 - 25°C 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 αντιδραστήριου 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 μίλε 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

- 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.
- Ασφαλίστε τις ταινίες μέσα στο πλαίσιο στήριξης.
- Διανείμετε με πιπέτα 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος επώασης σε όλες τις υποδοχές.
- Διανείμετε με πιπέτα 200 μl από κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα στις κατάλληλες υποδοχές.
- Επώαστε επί 2 ώρες σε 18 - 25°C σε οριζόντιο αναδευτήρα στις 700 rpm ± 100 rpm.
- Αναρροφήστε το υγρό από κάθε υποδοχή.
- Πλύνετε την πλάκα 3 φορές:
 - διανέμοντας 0,4 ml διαλύματος πλύσης σε κάθε υποδοχή.
 - αναρροφώντας το περιεχόμενο κάθε υποδοχής
- Διανείμετε με πιπέτα 100 μl μηδενικού βαθμονομητή σε όλες τις υποδοχές
- Διανείμετε με πιπέτα 50 μl συζεύγματος αντι-TNF-α μέσα σε όλες τις υποδοχές.
- Επώαστε επί 2 ώρες σε 18 - 25°C σε οριζόντιο αναδευτήρα στις 700 rpm ± 100 rpm.
- Αναρροφήστε το υγρό από κάθε υποδοχή.
- Πλύνετε την πλάκα 3 φορές:
 - διανέμοντας 0,4 ml διαλύματος πλύσης σε κάθε υποδοχή.
 - αναρροφώντας το περιεχόμενο κάθε υποδοχής
- Διανείμετε με πιπέτα 100 μl αποκαλυπτικού διαλύματος μέσα σε κάθε υποδοχή 15 λεπτά μετά το βήμα της πλύσης.
- Επώαστε την πλάκα μικροτιτλοδότησης επί 15 λεπτά σε 18 - 25°C σε οριζόντιο αναδευτήρα στις 700 rpm ± 100 rpm, αποφύγετε την άμεση

έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία.

- Διανείμετε με πιπέτα 100 μl ανασχετικού διαλύματος σε κάθε υποδοχή.
- Κάντε ανάγνωση των απορροφήσεων στα 450 nm και 490 nm (φίλτρο αναφοράς 630 nm ή 650 nm) εντός 30 λεπτών και υπολογίστε τα αποτελέσματα όπως περιγράφεται στην ενότητα XI.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

A. Πολυχρωματική ανάγνωση:

- Στην περίπτωση αυτή, την επεξεργασία των δεδομένων θα κάνει το λογισμικό του.
- Η ανάγνωση της πλάκας γίνεται πρώτα στα 450 nm έναντι ενός φίλτρου αναφοράς που ρυθμίζεται στα 650 nm (ή τα 630 nm).
- Εκτελείται δεύτερη ανάγνωση στα 490 nm έναντι του ίδιου φίλτρου αναφοράς.
- Το λογισμικό του 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.
- Βασική αρχή της επεξεργασίας των πολυχρωματικών δεδομένων έχει ως εξής:
 - $X_i = OD$ στα 450 nm
 - $Y_i = OD$ στα 490 nm
 - Χρησιμοποιώντας τυπική μη σταθμισμένη γραμμική παλινδρόμηση, υπολογίζονται οι παράμετροι A & B: $Y = A * X + B$
 - Αν $X_i < 3$ μονάδες OD, τότε υπολογισθέν $X = X_i$
 - Αν $X_i > 3$ μονάδες OD, τότε υπολογισθέν $X = (Y_i - B) / A$
 - 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

- Κάντε ανάγνωση της πλάκας στα 450 nm έναντι ενός φίλτρου αναφοράς που ρυθμίζεται στα 650 nm (ή τα 630 nm).
- Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- 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.
- Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε ορό ελέγχου και δείγμα με αναγωγή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
- 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-ELISA		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. ΑΠΟΔΟΣΗ 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 δέμευση, 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 ανασυνδυσμένο 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

Ασφάλειας

Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit 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 δυνητικός μολυσματικός.

Αποφύγετε κάθε επαφή με το δέρμα με όλα τα αντιδραστήρια. Το ανασχετικό διάλυμα περιέχει HCl. 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 18 - 25°C με συνεχή ανάδευση στις 700 rpm). Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε υποδοχής. Πλύνετε 3 φορές με 400 μ l διαλύματος πλύσης και αναρροφήστε.		
Μηδενικός βαθμονομητής Σύζευγμα αντι-TNF- α -HRP	100 50	100 50
Επώαστε επί 2 ώρες σε 18 - 25°C με συνεχή ανάδευση στις 700 rpm). Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε υποδοχής. Πλύνετε 3 φορές με 400 μ l διαλύματος πλύσης και αναρροφήστε.		
χρωμογόνου διαλύματος	100	100
Επώαστε επί 15 λεπτά σε 18 - 25°C με συνεχή ανάδευση στις 700 rpm).		
Ανασχετικό διάλυμα	100	100
Διαβάστε σε συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης και καταγράψτε την απορρόφηση κάθε υποδοχής στα 450 nm (και 490 nm) έναντι 630 (ή 650 nm)		



Olvassa el a teljes protokollt használat előtt!

TNF- α -ELISA

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 -ELISA 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 HÁTTER

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 gyulladáskeltő 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 gyulladáskeltő mediátort, mint például IL-1, IL-6, kolónia stimuláló faktorokat, prosztaglandinokat, vérlemezke-aktiváló faktort (PAF), kollagéneket, stb.
- *Metabolikus hatás:* TNF- α erősen gátolja a lipoprotein lipáz 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 előidézhet egyéb súlyosabb betegségeket is (pl. malária agyi formája). TNF- α gyakran kombinálódik más citokinekkal, részt vesz számos autoimmun betegségben és még az érlemeszesedés patogenezisében 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 patogenezisbe láthatjuk, hogy ezen meghatározás segítséget nyújthat a diagnosztizálásban (pl. graft kilökődés) és prognosztikai értéke van (pl. szisztémás fertőzéseknel).

IV. A VIZSGÁLAT ELVE

A DIALsource TNF- α –ELISA (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 abszorbanciát, mely arányos a TNF- α koncentrációjával. Felvesszük a kalibrációs görbét, majd a mintában lévő TNF- α koncentrációt interpolációval kapjuk a kalibrációs görbe alapján. ELISA olvasó használatával (linearitás legfeljebb 3 OD optikai denzitás egység) és a kifinomult adatredukciós módszerrel (polikromatikus adat redukció) kapott eredmények nagy érzékenységek alacsony és kiterjesztett kalibrációs tartományban is.

V. REAGENSZLET TARTALMA

Reagens	96 teszt Készlet	Színkód	Összetétel			
 Microtiter lemez 96 anti TNF- α (monoklonális antitestekkel) bevont	96 lyuk	kék	Használatra kész.			
<table border="1" data-bbox="71 929 263 974"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Konjugát: HRP jelzett anti-TNF- α (monoklonális ellenanyagok) TRIS-maleát pufferben szarvasmarha szérum albuminnal és timol festékanyaggal	Ab	HRP	CONC	1 ampulla 0.75 ml	piros	Adjon hozzá konjugát puffert (lásd VII.)
Ab	HRP	CONC				
<table border="1" data-bbox="119 1086 231 1131"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Nulla kalibrátor human plazma, benzamidin és timol festékanyaggal	CAL	0	2 ampulla liofilizált	sárga	Adjon hozzá desztillált vizet (lásd a címkén a pontos mennyiséget).	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="119 1198 231 1243"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kalibrátor N = 1-től 5-ig (lásd az ampulla címkéjén a pontos mennyiséget) human plazma benzamidin és timol festékanyaggal	CAL	N	5 ampulla liofilizált	sárga	Adjon hozzá 2 ml desztillált vizet.	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="103 1355 247 1400"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Konjugát puffer: TRIS-maleát pufferben szarvasmarha szérum, EDTA és timol festékanyaggal	CONJ	BUF	1 ampulla 6 ml	piros	Használatra kész.	
CONJ	BUF					
<table border="1" data-bbox="103 1512 247 1556"> <tr> <td>INC</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Inkubáló puffer: TRIS-maleát pufferben szarvasmarha szérum, EDTA and timol festékanyaggal	INC	BUF	1 ampulla 6 ml	fekete	Használatra kész.	
INC	BUF					
<table border="1" data-bbox="103 1668 295 1713"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Koncentrált mosófolyadék (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 ampulla 10 ml	barna	Hígítsa meg 200 szorosára desztillált vízzel (használgon mágneses keverőt).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="103 1780 263 1825"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kontroll - N = 1 vagy 2 humán plazma, timol festékanyaggal	CONTROL	N	2 ampulla liofilizált.	ezüst	Adjon hozzá 2 ml desztillált vizet.	
CONTROL	N					
<table border="1" data-bbox="103 1892 327 1937"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> </tr> </table> Kromogén TMB (tetra-metil benzidin)	CHROM	TMB	1 ampulla 12 ml	barna	Használatra kész.	
CHROM	TMB					
<table border="1" data-bbox="103 1982 279 2027"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Leállító oldat: HCl 1.0N	STOP	SOLN	1 ampulla 12 ml	fehér	Használatra kész.	
STOP	SOLN					

- 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)

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.

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 lejárat 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 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 körültekintően végezzük a mintavételt, hogy elkerüljük a lehetséges szennyeződést, mely stimulálhatja TNF- α terméket vérszövetekben, 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 mosófolyadékot.

A keresztszennyezés 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 színtelennek 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 tesztcsíkokat 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 µl inkubáló puffert minden tesztlyukba.
4. Pipettázzon 200 µl-t mind a Kalibráló, Kontroll és minta oldatokból a megfelelő teszthelyekre.
5. Inkubálja 2 órán át 18 - 25°C, közben rázassa síkrázón 700 rpm ± 100 rpm fordulatszámmal.
6. Szívja le a folyadékot a tesztlyukokból.
7. Mossa a lemezt 3-szor egymás után:
 - Töltsön 0.4 ml mosófolyadékot minden lyukba
 - Teljesen szívjuk ki a lyukak tartalmát
8. Pipettázzon 100 µl-t a nulla kalibrátorból minden csöbe.
9. Mérjen 50 µl anti- TNF-α -HRP konjugáltat minden tesztlyukba.
10. Inkubálja 2 órán át 18 - 25°C, közben rázassa síkrázón 700 rpm ± 100 rpm fordulatszámmal.
11. Teljesen szívjuk ki a lyukak tartalmát.
12. Mossa a lemezt 3-szor egymás után:
 - Töltsön 0.4 ml mosófolyadékot minden lyukba
 - Teljesen szívjuk ki a lyukak tartalmát
13. Pipettázzon minden egyes csöbe 100 µl előhívó oldatot lehetőleg 15 percen belül a lemezmosást követően.
14. Inkubálja 15 percen át 18 - 25°C, közben rázassa síkrázón 700 rpm ± 100 rpm fordulatszámmal, védje a direkt napfénytől.
15. Pipettázzon 100 µl leállító oldatot minden csöbe.
16. Olvassa le az abszorbanciákat 450 nm és 490 nm (referensszűrő 630 nm vagy 650 nm) 30 percen belül és számítsa ki az eredményeket a XI. pontban leírtak alapján.

XI. EREDMÉNYSZÁMÍTÁS

A. Polikromatikus leolvasás:

1. Ebben az esetben 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 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:
 - X_i = optikai denzitás 450 nm hullámhosszon
 - Y_i = optikai denzitás 490 nm hullámhosszon
 - Használjunk nem súlyozott lineáris regressziót A és B paraméterek kiszámításához: $Y = A \cdot X + B$
 - Ha $X_i < 3$ OD egység, akkor $X = X_i$

- Ha $X_i > 3$ OD egység, akkor $X = (Y_i - B) / A$
- 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 (abcisszán, 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 -ELISA		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-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 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> ± SD (pg/ml)	CV (%)	szérum	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 : szórás; CV: relatív szórás

D. Visszanyerhetőség (Accuracy)

VISSZANYERHETŐSÉGI TESZT

Minta	hozzáadott TNF-α (pg/ml)	visszanyert TNF-α (pg/ml)	Visszanyerhetőség (%)
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 maradtnak, 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 fagyaszta 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 HCl 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, Kontrollok	50 200 -	50 - 200
Inkubálja 2 órán át 18 - 25°C, 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 18 - 25°C, közben rázassa síkrázón 700 rpm fordulatszámmal. Szívja le a folyadékot a tesztlyukakból. Mossa 3-szor 400 µl mosófolyadékkal és szívja le.		
kromogén oldat	100	100
Inkubálja 15 perccen át 18 - 25°C, közben rázassa síkrázón 700 rpm fordulatszámmal.		
Leállító oldat	100	100
Olvassa le mikrotiter lemezleolvasóval és mérje meg az abszorbanciát minden tesztlyukban 450 nm (és 490 nm-en) hullámhosszon 630 (vagy 650 nm) hullámhosszal szemben.		