

Інструкція з використання ФНП альфа (TNF-а) - ІФА



Уповноважений представник: ТОВ «НОВАМЕДЛАЙН», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1,
тел. (044) 223-83-18, info@novamedline.com, www.novamedline.com

REF**IL E-3100****IVD**

1. ВИКОРИСТАННЯ ЗА ПРИЗНАЧЕННЯМ

Імуноферментний аналіз для in vitro кількісного вимірювання фактора некрозу пухлини людини α (TNF-α) у сироватці крові.

2. КЛІНІЧНИЙ ФОН**1.1 Біологічна активність**

Фактор некрозу пухлини людини альфа (ФНП-α), який також називають кахектином, становить 157 р. неглікозилізований поліпептид цитокін, який в основному продукується активованими макрофагами (моноцитами). Ліпополісахарид (ЛПС), компонент клітинної стінки грамнегативних бактерій (ендотоксин), є потужним стимулом для виробництва ФНП-α макрофагами, і ФНП-α є важливим посередником відомих in vivo ефектів ЛПС, таких як геморагічний некроз пухлини, лихоманка, шок та активація нейтрофілів. Різні біологічні дії ФНП-α можна класифікувати як:

- Протипухлинна та регуляторна діяльність: ФНП-α виявляє селективну токсичність для пухлинних та інфікованих вірусом клітин. І навпаки, він ангіогенний та стимулює ріст культивованих фібробластів.
- Імуномодуюча та прозапальна активність: ФНП-α активує макрофаги, нейтрофіли та еозинофіли, а також ендотеліальні клітини (які проявляють прокоагулянтну активність). Він регулює вироблення антитіл В-клітинами і стимулює цитотоксичні Т-клітини. Він індукує вироблення кількох інших медіаторів запалення, таких як IL-1, IL-6, фактори, що стимулюють колонію, простагландини, фактор, що активує тромбоцити (PAF), колагенази тощо.
- Метаболічна активність: ФНП-α сильно пригнічує експресію ліпопротеїнової ліпази та гена адипоцитів.

1.2 Клінічне застосування

ФНП-α виконує головну патогенну роль: при кахексії, пов'язаній з хронічними інфекційними або раковими захворюваннями; при септичному шоці, де нейтралізація ФНП-α захищає від супутньої гострої летальності; при відторгненні трансплантата та хворобі "трансплантат проти господаря"; та при паразитарних інфекціях, де ФНП-α може забезпечити певний захист, але також сприяє більш важким формам захворювання (наприклад, церебральна форма малярії). ФНП-α, часто у поєднанні з іншими цитокінами, також брав участь у ряді аутоімунних захворювань і навіть у патогенезі атеросклерозу. Аномальні високі рівні сироваткового ФНП-α були описані при септичному шоці, відторгненні трансплантата, паразитарних інфекціях, раку, після гемодіалізу, під час терапії цитокінами (IL-2) in vivo тощо. Окрім розуміння патогенезу, ці визначення можуть забезпечити допомагають у діагностиці (наприклад, при відторгненні транспланта) і мають прогностичне значення (наприклад, при системних інфекціях).

2. ПРИНЦИПИ МЕТОДУ

Імуноферментний аналіз ФНП-α є твердофазним імуноферментним аналізом, посиленням ферментом, проведеним на мікропланшеті. В аналізі використовуються моноклональні антитіла (МАт), спрямовані проти різних епітопів ФНП-α. Калібратори та зразки реагують із захоплюючим моноклональним антитілом (МАт 1), покритим добре на мікротитраторі, та з моноклональним антитілом (МАт 2), міченим пероксидазою хрому (HRP). Після періоду інкубації, що дозволяє утворити бутерброд: покритий МАт 1 - ФНП-α людини - МАт 2 - HRP, мікропланшет промивається для видалення незв'язаного ферментно міченого антитіла. Зв'язані мічені ферментами антитіла вимірюють за допомогою хромогенної реакції. Додають хромогенний розчин (ТМБ) та інкубують. Реакцію зупиняють додаванням стоп-розчину і мікропланшет зчитують на відповідній довжині хвилі. Величина обороту субстрату визначається колориметрично шляхом вимірювання поглинання, яке пропорційне концентрації ФНП-α. Побудовується калібрувальна крива, а концентрація ФНП-α у зразках визначається інтерполяцією з калібрувальної кривої. Використання рідера ІФА (лінійність до 3 одиниць ОГ) та складний метод обробки даних (поліхроматична обробка даних) призводять до високої чутливості в низькому діапазоні та в розширеному діапазоні калібрування.

1. НАДАНІ РЕАГЕНТИ

ІЛ Е-3131 Мікропланшет - готовий до використання

Зміст: мікропланшет із лунками, покритими 96 анти-ФНП-α (моноклональні антитіла)

Колір: синій

ІЛ Е-3140 Кон'югат

Зміст: Кон'югат: мічений HRP анти-TNF-α (моноклональні антитіла) у TRIS-малеатному буфері з бичачим сироватковим альбуміном і тимолом

Об'єм: 1 x 0,75 мл

Підготовка: Додайте кон'югатний буфер (див. Розділ 6)

Колір: червоний

Калібратори та контролю - ліофілізовані

Версія: 1.0 Позначення Калібратори/контроль

IL E-3101 CAL 0	Калібратор 0	2 флакони
IL E-3102 CAL 1	Калібратор 1	1 флакон
IL E-3103 CAL 2	Калібратор 2	1 флакон
IL E-3104 CAL 3	Калібратор 3	1 флакон
IL E-3105 CAL 4	Калібратор 4	1 флакон
IL E-3106 CAL 5	Калібратор 5	1 флакон
IL E-3151 CONTROL1	Контроль 1	1 флакон
IL E-3152 CONTROL 2	Контроль 2	1 флакон

Зміст:

Калібратори (**див. Точні значення на етикетці флакона**) у плазмі людини, бензамідині та тимолі / Контролює плазму та тимол людини

Приготування:

Калібратор 0: **Додати** дистильовану воду (точний об'єм див. На етикетці)

Калібратор 1 - 5 / контролі 1 + 2: Додати 2 мл дистильованої води

Колірний :

Калібратори: жовтий

Контролі: сріблястий

IL E-3141 Кон'югатний буфер - готовий до використання

Зміст: кон'югатний буфер: буфер TRIS-малеат з бичачим сироватковим альбуміном, ЕДТА та тимолом Об'єм: 1 x 6 мл

Код кольору: червоний

Ідентифікація
небезпеки:



H312 Шкідливий при контакті зі шкірою

H315 Спричиняє подразнення шкіри.

H319 Спричиняє небезпечне пошкодження очей

H335 Може спричинити подразнення дихальних шляхів.

IL E-3113 **INC-BUFF** **Буфер для інкубації** - готовий до використання

Зміст: Інкубаційний буфер: буфер TRIS-малеат з бичачим сироватковим альбуміном, ЕДТА та тимолом Об'єм: 1 x 6 мл

Колір: чорний

Ідентифікація
небезпеки :



H312 Шкідливий при контакті зі шкірою

H315 Спричиняє подразнення шкіри.

H319 Спричиняє небезпечне пошкодження очей

H335 Може спричинити подразнення дихальних шляхів

IL E-3030 **WASH-CONC 200x** **Промивний розчин - 200x** концентрований

Містить: Промивний розчин (TRIS-HCl)

Об'єм: 1 x 10 мл

Приготування: Розведіть 200x дистильованою водою (використовуйте магнітну мішалку).

Колір :коричневий

IL E-3155 **SUBSTRATE** **ХромогенТМБ** – Готовий до використання

Зміст: Хромоген ТМБ (тетраметилбензидин)

Об'єм: 1 x 12 мл

Колір : коричневий

Містить: стоп розчин: 1.0N HCl

Об'єм: 1 x 12мл

Колір: білий

Ідентифікація небезпеки:



H314 Викликає сильні опіки шкіри та пошкодження очей.

1. Примітка:

1. Використовуйте калібратор 0 для розведення зразків. 1 пг препарату калібратора еквівалентний 40 мМОд NIBSC IS 87/650

1. МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ НАДАЮТЬСЯ

Наступний матеріал необхідний, але не передбачений у наборі:

1. Високоякісна дистильована вода
2. Піпетки для доставки: 50 мкл, 200 мкл, 1 мл і 10 мл (рекомендується використовувати точні піпетки з одноразовими пластиковими наконечниками)
3. Вихровий міксер
4. Магнітна мішалка
5. Горизонтальний шейкер для мікропланшетів з 700 об / хв \pm 100 об / хв
6. Вошер для мікропланшетів
7. Рідер мікропланшетів, здатний зчитувати при 450 нм, 490 нм та 650 нм (у випадку поліхроматичного зчитування) або здатний зчитувати при 450 нм та 650 нм (біхроматичне зчитування)

6. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТУ

Калібратори:

Відновіть нульовий калібратор до об'єму, зазначеного на етикетці флакона, дистильованою водою, а інші калібратори - 2 мл дистильованої води.

Контролі: Розведіть контролі з 2 мл дистильованої води.

Розчин кон'югату: слідкуючи за кількістю лунок, які слід використати, розведіть концентрований кон'югат буфером кон'югату в чистому скляному флаконі: див. таблицю нижче для об'ємів для піпетування.

Рекомендується одночасне приготування. Розведений кон'югат стабільний макс. 1 тиждень при 2 - 8 ° C.

Таблиця розведення кон'югатів

Кількість лунок	Концентрований кон'югат	Буфер кон'югатний	Робочий розчин
8	50 мкл	500 мкл	550 мкл
16	100 мкл	1000 мкл	1100 мкл
24	150 мкл	1500 мкл	1650 мкл
32	200 мкл	2000 мкл	2200 мкл
48	300 мкл	3000 мкл	3300 мкл
96	600 мкл	6000 мкл	6600 мкл

Робочий промивний розчин:

Приготуйте достатній об'єм робочого розчину для промивання, додавши 199 об'ємів дистильованої води до 1 об'єму промивного розчину (200x). Для гомогенізації використовуйте магнітну мішалку. Видаліть невикористаний робочий розчин для промивання в кінці дня.

ЗБЕРІГАННЯ ТА ТЕРМІНИ ПРИДАТНОСТІ РЕАГЕНТІВ

Перед відкриттям або відновленням всі компоненти наборів стабільні до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці флакона, якщо зберігати його при температурі від 2 до 8 ° C.

- Невикористані стріпи слід зберігати при температурі 2 - 8 ° C у закритому пакеті, що містить осушувач, до закінчення терміну придатності.
- Після відновлення калібратори та контролі стабільні протягом 4 днів при температурі від 2 до 8 ° C. Для більш тривалих періодів зберігання аліквоти слід виготовляти і витримувати при -20 ° C максимум 2 місяці. Уникайте послідовних циклів заморожування.
- Концентрований промивний розчин стабільний при 18-25 ° C до закінчення терміну придатності.
- Свіжоприготовлений робочий розчин для промивання слід використовувати в той же день.
- Після першого використання кон'югат стабільний до закінчення терміну придатності, якщо його зберігати в оригінальному добре закритому флаконі при температурі від 2 до 8 ° C.
- Зміни зовнішнього вигляду реагентів можуть свідчити про нестабільність або погіршення стану.

7. ЗБІР ЗРАЗКІВ І ПІДГОТОВКА

- Сироватку потрібно якнайшвидше видалити зі згустку еритроцитів після згортання та центрифугування та зберігати при 4 ° С. Якщо зразки не використовуються негайно, їх слід зберігати при -20 ° С протягом максимум 2 місяців та при -70 ° С для більш тривалого зберігання (максимум один рік).
- Уникайте подальших циклів заморожування.
- Перед використанням усі зразки повинні бути при температурі 18-25 ° С. Перед використанням зразки рекомендується перемішати на вихровому міксері.
- Умови відбору зразків можуть впливати на значення, тому під час відбору проб слід дотримуватися суворих запобіжних заходів, щоб уникнути домішок, що містяться в матеріалах для відбору зразків, які стимулюють вироблення ФНП-а клітинами крові і, таким чином, помилково збільшують значення ФНП-а у сироватці крові.
- Збірні пробірки не повинні містити азоту.

8. ПРОЦЕДУРА

9.1 Примітки щодо поводження

- Не використовуйте набір або компоненти після закінчення терміну придатності.
- Не змішуйте матеріали з різних партій наборів
- Перед використанням доведіть всі реагенти до 18-25 ° С.
- Ретельно перемішайте всі реагенти та зразки, обережно перемішуючи або закручуючи.
- Виконуйте калібратори, контролі та зразки у двох примірниках. Рекомендується вертикальне вирівнювання.
- Для приготування промивного розчину використовуйте чисту пластикову ємність
 - Щоб уникнути перехресного забруднення, використовуйте чистий одноразовий наконечник піпетки для додавання кожного реагенту та зразка.
 - Для дозування розчину для розкриття та стоп розчину уникайте піпеток з металевими частинами.
 - Високоточні піпетки або автоматизоване обладнання для піпетування покращать точність.
 - Беріть до уваги час інкубації.
- Щоб уникнути дрейфу, час між піпетуванням першого калібратора та останнього зразка повинен бути обмежений часом, зазначеним у розділі 12.5 (Часова затримка).
- Підготуйте калібрувальну криву для кожного циклу, не використовуйте дані попередніх циклів.
- Розчин відкриття повинен бути безбарвним. Якщо протягом декількох хвилин після приготування з'являється синій колір, це означає, що реагент непридатний для використання, і його слід викинути.
- Розподіліть Розчин для розкриття протягом 15 хвилин після миття мікропланшету.
- Під час інкубації з розчином для розкриття уникайте потрапляння прямих сонячних променів на мікропланшет.

9.2 Процедура

1. Виберіть необхідну кількість стріпів для прогону. Невикористані стріпи слід повторно закрити в пакеті з осушувачем і зберігати при температурі 2 - 8 ° С. 2. Закріпіть стріпи в тримачу.
3. Прокапати 50 мкл інкубаційного буфера у всі лунки.
4. Прокапайте по 200 мкл кожного калібратора, контролю та зразка у відповідні лунки.
5. Інкубуйте 2 години при 18-25 ° С на горизонтальному шейкері, встановленому на 700 об / хв ± 100 об / хв.
6. Аспіруйте рідину з кожної лунки.
7. Промийте планшет 3 рази, виконавши:
 - Розподіл 0,4 мл промивного розчину в кожну лунку
 - Аспірацію вмісту кожної лунки
8. Прокапати 100 мкл нульового калібратора у всі лунки.
9. Прокапайте піпеткою 50 мкл кон'югату проти ФНП-а-HRP у всі лунки.
10. Інкубуйте 2 години при 18-25 ° С на горизонтальному шейкері, встановленому на 700 об / хв ± 100 об / хв.
11. Аспіруйте рідину з кожної лунки.
12. Промийте планшет 3 рази, виконавши:
 - Розподіл 0,4 мл промивного розчину в кожну лунку
 - Аспірацію вмісту кожної лунки
13. Прокапайте 100 мкл розчину для розкриття у кожну лунку протягом 15 хвилин після етапу промивання.
14. Інкубуйте мікропланшет протягом 15 хвилин при 18 - 25 ° С на горизонтальному шейкері, встановленому на 700 об / хв ± 100 об / хв, уникайте попадання прямих сонячних променів.
15. Піпетуйте 100 мкл стоп-розчину в кожну лунку.
16. Прочитайте поглинання при 450 нм і 490 нм (еталонний фільтр 630 нм або 650 нм) протягом 30 хвилин і обчисліть результати, як описано в розділі 10.

10. РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

10.1 Поліхроматичне читання

1. У цьому випадку програмне забезпечення виконує обробку даних.

2. Планшет спочатку зчитується при 450 нм проти еталонного фільтра, встановленого на 650 нм (або 630 нм).

3. Друге зчитування проводиться при 490 нм проти того самого еталонного фільтра.

4. Програмне забезпечення буде керувати рідером автоматично і інтегруватиме обидва показання в поліхроматичну модель. Ця техніка може генерувати ОГ до 10.

5. Принцип поліхроматичної обробки даних такий:

- $X_i = \text{ОГ при } 450 \text{ нм}$ • $Y_i = \text{ОГ при } 490 \text{ нм}$
- За допомогою стандартної незваженої лінійної регресії розраховуються параметри A & B: $Y = A * X + B$
- Якщо $X_i < 3$ одиниці ОГ, тоді X розраховується = X_i • Якщо $X_i > 3$ одиниці ОГ, тоді X обчислюється = $(Y_i - B) / A$
- Для побудови калібрувальної кривої використовується 4-параметрова логістична крива.
- Концентрація ФНП-а у зразках визначається інтерполяцією на калібрувальній кривій.

10.2 Біхроматичне читання

1. Зчитайте планшет при 450 нм порівняно з еталонним фільтром, встановленим на 650 нм (або 630 нм).

2. Обчисліть середнє значення повторень визначень.

3. На напівлогарифмічному або лінійному міліметровому папері побудуйте графік значень ОГ (ординат) для кожного калібратора щодо відповідної концентрації TNF-а (абсциси) та проведіть калібрувальну криву через точки калібратора, з'єднавши нанесені точки прямими лініями.

4. Зчитайте концентрацію для кожного контролю та зразка шляхом інтерполяції на калібрувальній кривій.

5. Обробка даних за допомогою комп'ютера спростить ці розрахунки. Якщо використовується автоматична обробка результатів, рекомендується підгонка кривої логістичної функції з 4 параметрами.

ТИПОВІ ДАНІ

Наступні дані служать лише для ілюстрації і ніколи не повинні використовуватися замість калібрувальної кривої в режимі реального часу.

TNF-а -ІФА		ОГ одиниці Поліхроматична модель
Калібратор	0 пг/мл	0.045
	6.8 пг/мл	0.120
	18 пг/мл	0.259
	52 пг/мл	0.619
	176 пг/мл	1.435
	518 пг/мл	3.237

11. ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ ТА ОБМЕЖЕННЯ

11.1 Межа виявлення

Двадцять нульових калібраторів аналізували разом з набором інших калібраторів. Межа виявлення, визначена як видима концентрація на два стандартних відхилення вище середньої ОГ за нульового зв'язування, становила 0,7 пг / мл.

11.2 Специфічність

Не спостерігали значної перехресної реакції у присутності 50 нг IL-1а, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TNF -β, IFN-а, IFN-β, IFN-γ, TGF-β, GM-CSF, OSM, MIP-1а, MIP-1β, LIF, MCP-1, G-CSF та PAHCS. Цей аналіз ФНП-а є специфічним для природного та рекомбінантного ФНП-а людини.

11.3 Точність

В аналізі				Між аналізами			
сироватка	N	<X> ± СВ (пг/мл)	CV (%)	сироватка	N	<X> ± СВ (пг/мл)	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

СВ: стандартне відхилення; CV: Коефіцієнт варіації

12.4. Точність

Тест на відновлення

Зразок	Доданий ФНП-а (пг/мл)	Відновлений ФНП-а (пг/мл)	Відновлення (%)
Сироватка 1	0	6.2	-
	38.4	43.3	97
	83.9	90.0	100
	188.3	192.5	99
	408.2	376.2	91
Сироватка 2	0	3.8	-
	38.4	45.5	108
	83.9	91.2	104
	188.3	162.2	84
	408.2	379.2	92

Тест розведення

Зразок	Розведення	Теоретична конц. (пг / мл)	Виміряна конц. (пг / мл)
Сироватка 1	1	-	436.5
	2	218.3	212.4
	4	109.1	104.8
	8	54.6	59.5
	16	27.3	31.7
Сироватка 2	1	-	420.2
	2	210.1	211.2
	4	105.0	98
	8	52.5	58.3
	16	26.3	30.7

Зразки розбавляли нульовим калібратором.

12.5 Часова затримка між останнім калібратором та розподілом зразка

Як показано далі, результати аналізу залишаються точними, навіть якщо зразок розподіляється через 30 хвилин після додавання калібраторів у лунки з покриттям.

	t0	30 хв	45 хв
SC 1	202	183	222
SC 2	506	520	565

13. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

- Якщо результати, отримані для контролю 1 та / або контролю 2, не знаходяться в межах, зазначених на етикетці флакона, результати не можна використовувати, якщо не надано задовільного пояснення невідповідності.
- При бажанні кожна лабораторія може створити власні пули контрольних зразків, які слід зберігати замороженими в аліквотах. Контролі, що містять азид, будуть перешкоджати ферментативній реакції і не можуть бути використані.
- Критерії прийнятності різниці між повторюваними результатами зразків повинні спиратися на належну лабораторну практику
- Рекомендується регулярно аналізувати контролі як невідомі зразки для вимірювання мінливості аналізу. Ефективність аналізу слід контролювати за допомогою таблиць контролю якості контролів.
- Хорошою практикою є візуальна перевірка відповідності кривої, обраної комп'ютером.

14. РЕФЕРЕНТНІ ІНТЕРВАЛИ

Ці значення наведені лише для орієнтації; кожна лабораторія повинна встановити свій нормальний діапазон значень. Для орієнтирів, результати 30 зразків сироватки у здорових людей із низьким рівнем СРБ коливались від 4,6 до 12,4 пг / мл.

15. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Безпека

Тільки для діагностики in vitro. Компоненти людської крові, що входять до цього набору, були протестовані європейськими схваленими та / або затвердженими FDA методами та виявили негативним щодо HBsAg, анти-НСV, анти-ВІЛ-1 та 2. Жоден відомий метод не може дати повних гарантій того, що похідні крові людини не передають гепатит, СНІД та інші інфекції. Отже, поводження з реагентами, зразками сироватки або плазми повинно відповідати місцевим процедурам безпеки. Усі продукти тваринного походження та їх похідні були зібрані від здорових тварин. Компоненти великої рогатої худоби походять з країн, де не повідомлялося про ВСЕ. Тим не менше, компоненти, що містять тваринні речовини, слід розглядати як потенційно інфекційні. Уникайте контакту шкіри з усіма реагентами, Стоп Розчин містить HCl. У разі контакту ретельно промити водою. Не палити, не пити, не їсти та не застосовувати косметику в робочій зоні. Не піпетуйте через рот. Використовуйте захисний одяг та одноразові рукавички.

16. ЛІТЕРАУРА

1. BEUTLER B., CERAMI A. (1987)
Кахектин: більше, ніж фактор некрозу пухлини.
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)
Моноклональні антитіла проти кахектину / TNF запобігають септичному шоку під час летальної бактеріємії
Nature, 330 : 662-664.
3. FIGUET 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)
Рівні сироватки фактора некрозу пухлини- α (TNF α) та розчинних рецепторів TNF при інфекції вірусу імунодефіциту людини 1 типу - співвідношення з клінічними імунологічними та вірусологічними параметрами.
J. Inf. Dis., 169:420-424.
5. WAAGE A., HALSTENSEN A. and ESPEVIK T. (1987)
Зв'язок між фактором некрозу пухлини в сироватці крові та летальним наслідком у хворих на менінгококову хворобу
Lancet, 1 ; 355-357.
6. LEROUX-ROELS G., OFFNER F., PHILIPPE J. and VERMEULEN A. (1988)
Вплив систем збору крові на концентрації фактора некрозу пухлини в сироватці та плазмі
Clin. Chem., 34 ; 2373-2374.

17. РЕЗЮМЕ ПРОТОКОЛУ

	Калібратори (мкл)	Зразки/ Контролі (мкл)
Буфер інкубації Калібратори (0-5) Зразки, контролі	50 200 -	50 - 200
Інкубуйте 2 години при 18-25 ° С при постійному струшуванні при 700 об / хв. Аспіруйте вміст кожної лунки. Промити 3 рази 400 мкл промивного розчину та аспірувати		
Нульовий калібратор Кон'югат анти-ФНП- α -HRP	100 50	100 50
Інкубуйте 2 години при 18-25 ° С при постійному струшуванні при 700 об / хв. Аспіруйте вміст кожної лунки. Промити 3 рази 400 мкл промивного розчину та аспірувати.		
Хромогенний розчин	100	100
Інкубуйте 15 хв при 18-25 ° С при постійному струшуванні при 700 об / хв		
Стоп розчин	100	100
Прочитайте на рідері мікропланшетів і запишіть поглинання кожної лунки при 450 нм (і 490 нм) проти 630 (або 650 нм).		

ПОЗНАЧЕННЯ:

 Температура зберігання +2/°C	 Виробник	Містить достатньо для <n> тестів 
 Термін придатності	LOT Номер партії	Тільки для in-vitro діагностики! IVD
 Використовуйте інструкцію	CONT Вміст	CE CE маркування
 Попередження	Каталожний № REF	

1. VERWENDUNGSZWECK

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

2. KLINISCHER HINTERGRUND**2.1 Biologische Aktivität**

Der humane Tumor-Nekrose-Faktor Alpha (TNF- α) auch Cachectin genannt, ist ein 157 A.A. unglykosyliertes Polypeptid-Zytokin was hauptsächlich von aktivierten Makrophagen (Monozyten) hergestellt wird. Lipopolysaccharid (LPS), die Zellwand-Komponente gramnegativer Bakterien (Endotoxin), ist ein potenter Stimulus für die TNF- α Produktion durch Makrophagen und TNF- α stellt einen wichtigen Mediator des 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.

2.2 Klinische Anwendungen

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

3. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der TNF- α -ELISA ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay (ELISA) im Mikrotiterplattenformat. Der Assay benutzt monoklonale Antikörper (MAbs), die gegen verschiedene Epitope von TNF- α gerichtet sind. 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 enzymschriebene Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Gebundene enzymschriebene Antikörper werden durch eine Farbreaktion gemessen. Farblösung (TMB - H₂O₂) wird hinzugefügt und inkubiert. Die Reaktion wird durch Hinzufügen einer Stopplösung beendet und die Mikrotiterplatte wird bei adäquater Wellenlänge ausgewertet. Die Menge an Substratumsatz wird kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die proportional zur TNF- α -Konzentration ist.

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

4. MITGELIEFERTE REAGENZIEN**IL E-3131**

96

Microtiterplate - gebrauchsfertigInhalt: Mikrotiterplatte mit 96 anti TNF- α - beschichtete Wells (monoklonale Antikörper)

Farb-Code: blau

IL E-3140 **CONJUGATE-CONC** **Conjugate**

Inhalt: Konjugat: MRP beschriftete Anti- TNF- α (monoklonale Antikörper) in TRIS-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin und Thymol

Volumen: 1 x 0,75 ml

Vorbereitung: **Konjugatpuffer** zugeben (beachten Sie Abschnitt 6)

Farb-Code: rot

Calibrators und **Controls** - lyophilisiert

Art.-Nr.	Symbol	Kalibrator / Kontrolle	
IL E-3101	CAL 0	Kalibrator 0	2 Fläschchen
IL E-3102	CAL 1	Kalibrator 1	1 Fläschchen
IL E-3103	CAL 2	Kalibrator 2	1 Fläschchen
IL E-3104	CAL 3	Kalibrator 3	1 Fläschchen
IL E-3105	CAL 4	Kalibrator 4	1 Fläschchen
IL E-3106	CAL 5	Kalibrator 5	1 Fläschchen
IL E-3151	CONTROL 1	Kontrolle 1	1 Fläschchen
IL E-3152	CONTROL 2	Kontrolle 2	1 Fläschchen

Inhalt: Kalibratoren (genaue Werte auf dem Fläschchenetikett) in Humanplasma mit Benzamidin und Thymol

Kontrollen: Humanplasma mit Thymol

Vorbereitung: Kalibrator 0: **Dest. Wasser zugeben** (das exakte Volumen bitte dem Etikett entnehmen)

Kalibrator 1 - 5 / Kontrolle 1 + 2: 2 ml dest. Wasser **zugeben**

Farb-Code: Kalibratoren: gelb
Kontrollen: silber

IL E-3141 **CONJUGATE-BUFF** **Conjugate Buffer - gebrauchsfertig**

Inhalt: Konjugatpuffer: TRIS-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin, EDTA und Thymol

Volumen: 1 x 6 ml

Farb-Code: rot

Mögliche Gefahren:



H312 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
H315 Verursacht Hautreizungen.
H319 Verursacht schwere Augenreizung.
H335 Kann die Atemwege reizen.

IL E-3113 **INC-BUFF** **Incubation Buffer - gebrauchsfertig**

Inhalt: Inkubationspuffer: TRIS-Maleatpuffer mit Rinderserumalbumin, EDTA und Thymol

Volumen: 1 x 6 ml

Farb-Code: schwarz

Mögliche Gefahren:



H312 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
H315 Verursacht Hautreizungen.
H319 Verursacht schwere Augenreizung.
H335 Kann die Atemwege reizen.

IL E-3030 **WASH-CONC** **200x** **Wash Solution** - 200x konzentriert

Inhalt: Waschlösung (TRIS-HCl)

Volumen: 1 x 10 ml

Vorbereitung: 200x mit dest. Wasser **verdünnen** (Magnetrührer benutzen).

Farb-Code: braun

IL E-3155 **SUBSTRATE** **ChromogenTMB - gebrauchsfertig**

Inhalt: Chromogenes TMB (Tetramethylbenzidin)
 Volumen: 1 x 12 ml
 Farb-Code: braun

IL E-3080 **STOP-SOLN** **Stopping Solution - gebrauchsfertig**

Inhalt: Stopplösung: 1,0N HCl
 Volumen: 1 x 12 ml
 Farb-Code: weiß
 Mögliche
 Gefahren:



H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

Bemerkung:

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

5. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

1. Hochwertiges destilliertes Wasser
2. Pipetten: 50 µl, 200 µl, 1 ml und 10 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegplastikspitzen wird empfohlen)
3. Vortex Mixer
4. Magnetrührer
5. Horizontaler Schüttler für Mikrotiterplatte Kap. 700 rpm ± 100 rpm
6. Waschgerät für Mikrotiterplatten
7. Mikrotiterplatten-Lesegerät zur Auswertung bei 450 nm, 490 nm und 650 nm (bei polychromatischer Auswertung) oder zur Auswertung bei 450 nm und 650 nm (monochromatische Auswertung)

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN**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 untenstehender Tabelle. Frisch herstellen wird empfohlen. Das verdünnte Konjugat ist maximal eine Woche bei 2 - 8 °C stabil.

Tabelle Konjugatverdünnung

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

Waschlösung:

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

7. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder der Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2 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 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.

8. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Das Serum muss so schnell wie möglich vom Blutgerinnsel der roten Zellen nach Gerinnung und Zentrifugation getrennt und bei 4 °C aufbewahrt werden. Werden die Proben nicht direkt benutzt, müssen sie bei -70 °C für maximal 1 Jahr gelagert werden.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Vor Gebrauch müssen alle Proben 18 - 25 °C erreichen. Vortexmischen der Proben wird vor Gebrauch empfohlen.
- Die Bedingungen der Probennahme können Werte beeinflussen, weshalb strenge Vorsichtsmaßnahmen während des Sammelns ergriffen werden müssen, um Unreinheiten im gesammelten Material, die die TNF- α Produktion durch Blutzellen stimulieren und somit Serum TNF- α Werte fälschlich steigern könnten, zu vermeiden.
- Sammelröhrchen dürfen kein Pyrogen enthalten.

9. DURCHFÜHRUNG

9.1 Bemerkungen zur Durchführung

- Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum.
- Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf 18 - 25 °C.
- Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.
- Führen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben doppelt aus. Vertikale Ausrichtung wird empfohlen.
- Verwenden Sie zur Zubereitung der Waschlösung reinen Kunststoffbehälter.
- Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Verwenden Sie zur Pipettierung der Substratlösung und der Stopplösung keine Pipetten mit Metallteilen.
- Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.
- Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.
- Zur Vermeidung von Drift muss die Zeit zwischen dem Pipettieren des ersten Kalibrators und der letzten Probe auf die Zeit beschränkt werden, die in Abschnitt 12.5 (Zeitverzögerung) erwähnt wird.
- Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.
- Pipettieren Sie die Substratlösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte.
- Während der Inkubation mit der Substratlösung ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

9.2 Durchführung

1.	Wählen Sie die erforderliche Anzahl der Streifen für den Lauf aus. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen sollten wieder dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2 bis 8 °C gelagert werden.
2.	Befestigen Sie die Streifen im Halterahmen.
3.	Pipettieren Sie 50 µl Inkubationspuffer in alle Wells.
4.	Pipettieren Sie jeweils 200 µl Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Wells.
5.	Inkubieren Sie 2 Stunden bei 18 - 25 °C auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm.
6.	Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
7.	Waschen Sie die Platte dreimal: <ul style="list-style-type: none">• pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jeden Well• saugen Sie der Inhalt jedes Wells ab
8.	Pipettieren Sie 100 µl Null-Kalibrator in alle Wells.
9.	Pipettieren Sie 50 µl Anti- TNF-α -MRP-Konjugat in alle Wells.
10.	Inkubieren Sie 2 Stunden bei 18 - 25 °C auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm.
11.	Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
12.	Waschen Sie die Platte dreimal: <ul style="list-style-type: none">• pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jeden Well• saugen Sie der Inhalt jedes Wells ab
13.	Pipettieren Sie 100 µl der Substratlösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jeden Well.
14.	Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 15 Minuten bei 18 - 25 °C auf horizontalem Schüttler bei 700 rpm ± 100 rpm; vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
15.	Pipettieren Sie 100 µl der Stopplösung in jeden Well.
16.	Werten Sie die Absorptionen bei 450 nm und 490 nm (Referenzfilter 630 nm oder 650 nm) innerhalb 30 Minuten aus und berechnen Sie die Resultate wie in Abschnitt 10 beschrieben.

10. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

10.1 Polychromatische Auswertung

1. In diesem Fall werden die Daten durch die Software verarbeitet.
2. Die Platte wird zunächst bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) ausgewertet.
3. Eine zweite Auswertung erfolgt bei 490 nm gegen denselben Referenzfilter.
4. Die Software steuert das Lesegerät automatisch und integriert beide Auswertungen in ein polychromatisches Modell. Diese Technik kann ODs bis 10 erstellen.
5. Das Prinzip der polychromatischen Datenauswertung funktioniert wie folgt:
 - X_i = 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.

10.2 Bichromatische Auswertung

1. Werten Sie die Platte bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) aus.
2. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
3. Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration TNF-α (Abszisse) und zeichnen Sie eine Kalibrationskurve durch die Kalibrationspunkte, indem Sie die eingetragenen Punkte durch gerade Linien verbinden.
4. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Kalibrationskurve.
5. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer "4 Parameter"-Kurvenfunktion.

11. TYPISCHE WERTE

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

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

12. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

12.1 Nachweisgrenze

Zwanzig Null-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.

12.2 Spezifität

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

12.3 Präzision

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

SD: Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

12.4 Genauigkeit

Wiederfindungstest

Probe	zugegebenes TNF- α (pg/ml)	wiedergefundenes TNF- α (pg/ml)	Wiederfindung (%)
Serum 1	0	6,2	-
	38,4	43,3	97
	83,9	90,0	100
	188,3	192,5	99
	408,2	376,2	91
Serum 2	0	3,8	-
	38,4	45,5	108
	83,9	91,2	104
	188,3	162,2	84
	408,2	379,2	92

Verdünnungstest

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

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

12.5 Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im Folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann gewährleistet ist, wenn die Probe 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugegeben wird.

	t0	30 min	45 min
SC 1	202	183	222
SC 2	506	520	565

13. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

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

14. REFERENZ INTERVALLE

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

15. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

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

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

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

Vermeiden Sie Hautkontakt mit allen Reagenzien; Stopplösung enthält HCl, Bei Kontakt gründlich mit Wasser spülen.

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












16. LITERATUR

1. BEUTLER B., CERAMI A. (1987)
Cachectin : more than a tumor necrosis factor.
 N. Engl. J. Med., 316 ; 379-385.
2. TRACEY K.J., FONG Y., HESSE D.G., MANOGUE K.R., LEE A.T., KUO G.C., LOWRY S.F. and CERAMI A. (1987)
Anti cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia.
 Nature, 330 : 662-664.
3. PIGUET P.F., GRAU G.E., ALLET B. and VASSALLI P. (1987)
 Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-versus-host disease.
 J. Exp. Med., 166 ; 1280-1289.
4. AUKRUST P., LIABAKK N-B., MÜLLER F., LIEN E., ESPEVIK T. and FROLAND S.S. (1994)
Serum Levels of Tumor Necrosis Factor- 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.

17. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	Kalibratoren (μ l)	Probe(n) / Kontrollen (μ l)
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 μ l 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 μ l 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.		

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis		Chargennummer		In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen		Inhalt		CE gekennzeichnet
	Achtung		Katalog-Nummer		