

# Product information



User's Manual



Distribuito in ITALIA da  
**Li StarFish S.r.l.**  
Via Cavour, 35  
20063 Cernusco S/N (MI)  
telefono 02-92150794  
fax 02-92157285  
info@listarfish.it  
www.listarfish.it

## TNF-alpha human ELISA

Enzyme immunoassay for the quantitative measurement of human Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-alpha) in serum



**DE4641**



**96 wells**

## 1. INTENDED USE

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

## 2. CLINICAL BACKGROUND

### A. Biological activities

Human Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) 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- $\alpha$  production by macrophages and TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  may be classified as:

- Antitumoral and growth regulatory activities: TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  strongly inhibits lipoprotein lipase and adipocyte gene expression.

### B. Clinical application

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

## 3. PRINCIPLES OF THE METHOD

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

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

**4. REAGENTS PROVIDED**

Reagents	96 tests Kit	Reconstitution
<b>SORB MT</b> Microtiterplate with 96 anti TNF- $\alpha$ (monoclonal antibodies) coated wells	96 wells	<b>Ready</b> for use
<b>ENZ CONJ</b> Conjugate: HRP labelled anti-TNF- $\alpha$ (monoclonal antibodies) in TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin and thymol	1 vial 0.75 ml	<b>Add</b> conjugate buffer (see section 6)
<b>CAL 0</b> Zero calibrator in human plasma, benzamidin and thymol	2 vials lyophil.	<b>Add</b> distilled water (see on the QC data sheet for the exact volume)
<b>CAL 1 - 5</b> Calibrator N = 1 to 5 (see exact values on QC data sheet) in human plasma, benzamidin and thymol	5 vials lyophil.	<b>Add</b> 2 ml distilled water
<b>ENZ CONJ DIL</b> Conjugate buffer: TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin, EDTA and thymol	1 vial 6 ml	<b>Ready</b> for use
<b>INC BUF</b> Incubation buffer: TRIS-Maleate buffer with bovine serum albumin, EDTA and thymol	1 vial 6 ml	<b>Ready</b> for use
<b>WASH SOLN 200x</b> Wash Solution (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	<b>Dilute</b> 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
<b>CONTROL 1 &amp; 2</b> Controls - N = 1 or 2 in human plasma and thymol	2 vials lyophil.	<b>Add</b> 2 ml distilled water
<b>SUB TMB</b> Chromogen TMB (Tetramethylbenzidine)	1 vial 12 ml	<b>Ready</b> for use
<b>STOP SOLN</b> Stopping solution: HCl 1.0N	1 vial 12 ml	<b>Ready</b> for use

**Note:** 1. Use the zero calibrator for sample dilutions.  
2. 1 pg of the calibrator preparation is equivalent to 40 mIU of the NIBSC IS 87/650.

**5. SUPPLIES NOT PROVIDED**

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

1. High quality distilled water
2. Pipettes for delivery of: 50  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1 ml and 10 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Horizontal microtiterplate shaker capable of 700 rpm  $\pm$  100 rpm
6. Washer for microtiterplates
7. Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm, 490 nm and 650 nm (in case of polychromatic reading) or capable of reading at 450 nm and 650 nm (bichromatic reading)

## 6. REAGENT PREPARATION

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

TABLE CONJUGATE DILUTION

Number of wells	Concentrated conjugate	Conjugate buffer	Working volume
8	50 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

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

## 7. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the vial label, if kept at 2 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.

## 8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum must be removed as soon as possible from the clot of red cells after clotting and centrifugation, and kept at 4°C. If the samples are not used immediately, they must be kept at -20°C for maximum 2 months, and at -70°C for longer storage (maximum one year).
- Avoid subsequent freeze thaw cycles.
- Prior to use, all samples should be at 18 - 25°C. It is recommended to vortex the samples before use.
- Sampling conditions can affect values, therefore, strict precautions have to be taken during sampling to avoid impurities contained in sampling materials that would stimulate TNF-α production by blood cells and thus falsely increase serum TNF-α values.
- Collection tubes must be pyrogen-free.

## 9. PROCEDURE

### 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 12 paragraph E (Time delay).
- Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.
- The Revelation Solution should be colourless. If a blue colour develops within a few minutes after preparation, this indicates that the reagent is unusable, and must be discarded.
- Dispense the Revelation Solution within 15 minutes following the washing of the microtiterplate.
- During incubation with Revelation Solution, avoid direct sunlight on the microtiterplate.

### B. Procedure

1. Select the required number of strips for the run. The unused strips should be resealed in the bag with a desiccant and stored at 2-8°C.
2. Secure the strips into the holding frame.
3. Pipette 50 µl of 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 10.

## 10. 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:
  - $X_i = \text{OD at 450 nm}$
  - $Y_i = \text{OD at 490 nm}$
  - Using a standard unweighted linear regression, the parameters A & B are calculated:  
 $Y = A \cdot X + B$
  - If  $X_i < 3$  OD units, then X calculated =  $X_i$
  - If  $X_i > 3$  OD units, then X calculated =  $(Y_i - B) / A$
  - A 4 parameter logistic curve fitting is used to build up the calibration curve.
  - The TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points by connecting the plotted points with straight lines.
4. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
5. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4 parameter logistic function curve fitting is recommended.

## 11. TYPICAL DATA

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

TNF- $\alpha$ -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

**12. PERFORMANCE AND LIMITATIONS****A. Detection Limit**

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

**B. Specificity**

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

**C. Precision**

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

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

**D. Accuracy****RECOVERY TEST**

Sample	Added TNF- $\alpha$ (pg/ml)	Recovered TNF- $\alpha$ (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 Conc. (pg/ml)	Measured Conc. (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

### 13. INTERNAL QUALITY CONTROL

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

### 14. REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values. For guidance, the results of 30 serum samples from apparently healthy persons with low CRP levels, ranged between 4.6 and 12.4 pg/ml.

### 15. PRECAUTIONS AND WARNINGS

#### **Safety**

For in vitro diagnostic use only.

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

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

Avoid any skin contact with all reagents, Stop Solution contains HCl. In case of contact, wash thoroughly with water.

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

**16. 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- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 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. SUMMARY OF THE PROTOCOL**

	<b>CALIBRATORS (<math>\mu</math>l)</b>	<b>SAMPLE(S) CONTROLS (<math>\mu</math>l)</b>
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 $\mu$ l of Wash Solution and aspirate.		
Zero Calibrator	100	100
Anti-TNF- $\alpha$ -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 $\mu$ 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)		

## 1. USO DEL KIT

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

## 2. INFORMAZIONI CLINICHE

### A. Attività biologiche

Il Fattore di Necrosi Tumorale Alfa (TNF- $\alpha$ ), 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- $\alpha$  da parte dei macrofagi, inoltre il TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  possono essere classificate come segue:

- Attività antitumorali e regolatorie della crescita: il TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  attiva macrofagi, neutrofili ed eosinofili, nonché le cellule endoteliali (con attività procoagulante). Regola la produzione anticorpale dei linfociti B e stimola i linfociti T citotossici. Induce la produzione di molti altri mediatori dell'infiammazione, quali IL-1, IL-6, fattori stimolanti le colonie, prostaglandine, fattore attivante le piastrine (PAF), collagenasi ecc.
- Attività metaboliche: Il TNF- $\alpha$  inibisce fortemente la lipoproteina lipasi e l'espressione genica in adipociti.

### B. Applicazione clinica

Il TNF- $\alpha$  riveste un ruolo patogenetico importante nella cachessia associata a malattie infettive croniche o cancerose, nello shock settico, dove la neutralizzazione del TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  può fornire una protezione ma favorire anche l'insorgenza di forme più gravi della malattia (es. malaria cerebrale). Il TNF- $\alpha$ , 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- $\alpha$  è stata evidenziata in associazione a shock settico, rigetto del trapianto, infezioni parassitarie, cancro, in fase post-emofiltrazione, durante terapia con citochine (IL-2) in vivo, ecc. Oltre a fornire informazioni utili riguardo alla patogenesi, tale determinazione potrebbe costituire un supporto diagnostico (es. in caso di rigetto del trapianto) ed avere un valore prognostico (es. nelle infezioni sistemiche).

## 3. PRINCIPIO DEL METODO

TNF- $\alpha$  -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- $\alpha$ . 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- $\alpha$  umana - MAB 2 - HRP, la piastra di microtitolazione viene lavata per rimuovere l'anticorpo marcato con enzima non legato. L'anticorpo marcato con enzima non legato viene misurato attraverso una reazione cromogenica. Si procede quindi con l'aggiunta della soluzione cromogena (TMB) e successiva incubazione. La reazione viene interrotta con l'aggiunta di Soluzione di arresto; quindi la piastra di microtitolazione viene letta alla lunghezza d'onda adeguata. La quantità di turnover del substrato viene determinata colorimetricamente misurando l'assorbanza che è proporzionale alla concentrazione di TNF- $\alpha$ .

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

**4. REATTIVI FORNITI**

Reattivi	Kit da 96 test	Volume di ricostituzione
<b>SORB</b> <b>MT</b> Piastra di microtitolazione con 96 pozzetti, rivestiti anti TNF- $\alpha$ (anticorpi monoclonali)	96 pozzetti	Pronte per l'uso
<b>ENZ</b> <b>CONJ</b> Coniugato: anti- TNF- $\alpha$ (anticorpi monoclonali) marcato con HRP in tampone TRIS-maleato con albumina di siero bovino e timolo	1 fialone 0,75 ml	<b>Aggiungere</b> il tampone del coniugato (vedi paragrafo 6)
<b>CAL</b> <b>0</b> Calibratore Zero: plasma umano con benzamidina e timolo	2 fialoni liofiliz	<b>Aggiungere</b> acqua distillata (vedi QC data sheet per volume esatto)
<b>CAL</b> <b>1 - 5</b> Calibratore N= 1-5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle QC data sheet) in plasma umano con benzamidina e timolo.	5 fialoni liofiliz.	Aggiungere 2 ml di acqua distillata
<b>ENZ</b> <b>CONJ</b> <b>DIL</b> Tampone del coniugato: tampone TRIS-maleato con albumina di siero bovino, EDTA e timolo.	1 fialone 6 ml	Pronte per l'uso
<b>INC</b> <b>BUF</b> Tampone di incubazione: tampone TRIS-maleato con albumina di siero bovino, EDTA e timolo	1 fialone 6 ml	Pronte per l'uso
<b>WASH</b> <b>SOLN</b> <b>200x</b> Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	1 fialone 10 ml	Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico)
<b>CONTROL</b> <b>1</b> & <b>2</b> Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano e timolo	2 fialoni liofiliz.	Aggiungere 2 ml di acqua distillata
<b>SUB</b> <b>TMB</b> Soluzione Cromogena TMB (tetrametilbenzidina)	1 fialone 12 ml	Pronte per l'uso
<b>STOP</b> <b>SOLN</b> Soluzione di arresto: HCl 1.0N	1 fialone 12 ml	Pronto per l'uso

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

**5. REATTIVI NON FORNITI**

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

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

## 6. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. Calibratore:** Ricostituire il calibratore zero con acqua distillata fino al volume indicato sulle QC data sheet e gli altri calibratori con 2 ml di acqua distillata.
- B. Controlli:** Ricostituire i controlli con 2 ml di acqua distillata.
- C. Coniugato Anti-TNF- $\alpha$  -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 $\mu$ l	500 $\mu$ l	550 $\mu$ l
16	100 $\mu$ l	1000 $\mu$ l	1100 $\mu$ l
24	150 $\mu$ l	1500 $\mu$ l	1650 $\mu$ l
32	200 $\mu$ l	2000 $\mu$ l	2200 $\mu$ l
48	300 $\mu$ l	3000 $\mu$ l	3300 $\mu$ l
96	600 $\mu$ l	6000 $\mu$ l	6600 $\mu$ l

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

## 7. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°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.

## 8. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- A coagulazione e centrifugazione avvenute, il siero dovrà essere rimosso al più presto dal coagulo di eritrociti e conservato a 4°C. In caso di utilizzo non immediato, dovranno essere conservati a -20°C per 2 mesi al massimo e a -70°C per un tempo maggiore (massimo un anno).
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- Prima dell'impiego, tutti i campioni devono essere a 18 - 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- $\alpha$  da parte delle cellule ematiche con conseguente aumento falsato dei livelli sierici di TNF- $\alpha$ .
- Le provette di raccolta devono essere apirogene.

## 9. METODO DEL DOSAGGIO

### A. Avvertenze generali

- Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza.
- Non mescolare reattivi di lotti diversi.
- Prima dell'uso portare tutti i reattivi a 18 - 25°C.
- Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione.
- Eseguire calibratori, controlli e campioni in doppio. Si raccomanda l'allineamento verticale.
- Utilizzare un contenitore di plastica pulito per preparare la soluzione di lavaggio.
- Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.
- Per la distribuzione della Soluzione di Rivelazione e la Soluzione di arresto evitare pipette con parti metalliche.
- L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio.
- Rispettare i tempi di incubazione.
- Per evitare derive, l'intervallo tra il pipettaggio del primo calibratore e l'ultimo campione deve essere limitato ai tempi riportati nella sezione 12, paragrafo E (Tempo Trascorso).
- Allestire una curva di calibrazione per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di calibrazione di sedute analitiche precedenti.
- La Soluzione di Rivelazione deve essere incolore. L'eventuale sviluppo di un colore blu entro pochi minuti dalla preparazione indica che il reagente è inutilizzabile e deve essere eliminato.
- Distribuzione della Soluzione di Rivelazione entro 15 minuti dopo il lavaggio della piastra di microtitolazione.
- Durante l'incubazione con la Soluzione di Rivelazione evitare la luce diretta del sole sulla piastra di microtitolazione.

### B. Metodo del dosaggio

1. Selezionare il numero di strisce reagenti necessario per il test. Le strisce reagenti inutilizzate devono essere risigillate nel contenitore con un essiccante e conservate a 2-8°C.
2. Assicurare le strisce reagenti nel telaio di supporto.
3. Pipettare 50 µl di Tampone di Incubazione in ogni pozzetto
4. Pipettare 200 µl di ogni calibratore, controllo e campione nei pozzetti adeguati.
5. Incubare per 2 ore a 18 - 25°C su agitatore orizzontale regolato a 700 ± 100 rpm.
6. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
7. Lavare la piastra 3 volte :
  - versando 0,4 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
  - aspirando il contenuto di ogni pozzetto
8. Pipettare 100 µl del calibratore zero in tutti i pozzetti.
9. Pipettare 50 µl di coniugato anti- TNF-α –HRP in tutti i pozzetti.
10. Incubare per 2 ore a 18 - 25°C su agitatore orizzontale regolato a 700 ± 100 rpm.
11. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
12. Lavare la piastra 3 volte :
  - versando 0,4 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
  - aspirando il contenuto di ogni pozzetto
13. Pipettare 100 µl della soluzione di rivelazione preparata di fresco in ogni pozzetto entro 15 minuti dal termine della fase di lavaggio.
14. Incubare la piastra di microtitolazione per 15 minuti a 18 - 25°C su un agitatore orizzontale a 700 ± 100 rpm; evitare la luce diretta del sole.
15. Pipettare 100 µl di soluzione di arresto in ogni pozzetto.
16. Leggere le assorbanze a 450 nm a 490 nm (filtro di riferimento a 630 nm o 650 nm) entro 30 minuti e calcolare i risultati come descritto nella sezione 10.

## 10. CALCOLO DEI RISULTATI

### A. Lettura policromatica:

1. In questo caso, l'elaborazione dati verrà effettuata dal software.
2. La piastra viene letta a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
3. Verrà quindi effettuata una seconda lettura a 490 nm rispetto allo stesso filtro di riferimento.
4. Il Software guiderà automaticamente il lettore e integrerà le due letture utilizzando un modello policromatico. Tale tecnica può generare valori fino a 10 OD.
5. Il principio dell'elaborazione policromatica dei dati è la seguente:
  - $X_i = \text{OD a } 450 \text{ nm}$
  - $Y_i = \text{OD at } 490 \text{ nm}$
  - Utilizzando una regressione lineare standard non pesata, i parametri A & B sono calcolati:  
 $Y = A \cdot X + B$
  - Se  $X_i < 3$  unità OD, X calcolato =  $X_i$
  - Se  $X_i > 3$  unità OD, X calcolato =  $(Y_i - B) / A$
  - Per tracciare la curva di calibrazione viene utilizzato un modello di adattamento della curva logistica a 4 parametri.
  - La concentrazione di TNF- $\alpha$  nel campione viene determinata per interpolazione sulla curva di calibrazione.

### B. Lettura bicromatica

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

## 11. CARATTERISTICHE TIPICHE

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

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

**12. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO****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 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TNF- $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF, OSM, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , LIF, MCP-1, G-CSF e RANTES. Tale test per il dosaggio del TNF- $\alpha$  è specifico per il TNF- $\alpha$  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- $\alpha$ aggiunta (pg/ml)	TNF- $\alpha$ recuperata (pg/ml)	Recupero (%)
Siero 1	0	6,2	-
	38,4	43,3	97
	83,9	90,0	100
	188,3	192,5	99
	408,2	376,2	91
Siero 2	0	3,8	-
	38,4	45,5	108
	83,9	91,2	104
	188,3	162,2	84
	408,2	379,2	92

## TEST DI DILUIZIONE

Campione	Diluizione	Conc. teorica (pg/ml)	Conc. 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

### 13. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

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

### 14. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

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

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

### 15. PRECAUZIONI PER L'USO

#### Sicurezza

#### **Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.**

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

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

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

In caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua.

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

#### 16. 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- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 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. SCHEMA DEL DOSAGGIO**

	<b>CALIBRATORE (<math>\mu</math>l)</b>	<b>CAMPIONI CONTROLLI (<math>\mu</math>l)</b>
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 $\mu$ l di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Calibratore Zero	100	100
Coniugato Anti-TNF- $\alpha$ -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 $\mu$ 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)		

## SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore



Distribuito in ITALIA da  
**Li StarFish S.r.l.**  
 Via Cavour, 35  
 20063 Cernusco S/N (MI)  
 telefono 02-92150794  
 fax 02-92157285  
 info@listarfish.it  
 www.listarfish.it