

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:
 - $X_i = \text{OD bei } 450 \text{ nm}$
 - $Y_i = \text{OD bei } 490 \text{ nm}$
 - Standard nicht gewichtet lineare Regression, Parameter A & B werden berechnet: $Y = A \cdot X + B$
 - Wenn $X_i \leq 3$ 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.		

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

Symbole:

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