Arbeitsanleitung / Manual

IDK® TNFα ELISA

Zur in-vitro-Bestimmung von TNF-α in Serum, Plasma, Stuhl und Zellkulturüberstand

For the in vitro determination of TNFα in serum, plasma, stool and cell culture supernatant

Gültig ab / Valid from 2017-10-19

REF **K 9610**

Σ 96

+8 °C / +2 °C

IVD

CE

Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
Tel.: +49 6251 70190-0 Fax: + 49 6251 849430
e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK 2

2. EINLEITUNG 2

3. INHALT DER TESTPACKUNG 2

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL 3

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN 4

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG 5

Probenlagerung 5
Stuhlprobenextraktion 5

7. TESTDURCHFÜHRUNG 6

Testprinzip 6
Pipettierschema 7

8. ERGEBNISSE 8

9. EINSCHRÄNKUNGEN 9

10. QUALITÄTSKONTROLLE 9

Referenzwerte 10

11. TESTCHARAKTERISTIKA 10

Präzision und Reproduzierbarkeit 10
Analytische Sensitivität 10
Spezifität 10
Linearität 10

12. VORSICHTSMASSNAHMEN 11

13. TECHNISCHE MERKMALE 11

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST 12

15. LITERATUR 12

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) aus Serum, Plasma, Stuhl und Zellkulturüberständen geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Der Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) ist ein Zytokin, welches an systemischen Entzündungsreaktionen beteiligt ist. Die primäre Aufgabe des TNF-α besteht in der Regulation von Immunzellen. TNF-α stimuliert die Akute-Phase-Reaktion, induziert apoptotischen Zelltod, zelluläre Proliferation und Differenzierung, hemmt das Tumorwachstum und die virale Replikation. Die Dysregulation der TNF-α-Produktion wurde mit einer Vielzahl Erkrankungen wie Krebs und Alzheimer in Zusammenhang gebracht.

TNF-α wird nach einer Stimulation durch bakterielle Lipopolysaccharide von Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen, T-Zellen sowie natürlichen Killerzellen sezerniert. Humanes TNF-α ist ein nichtglykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 17,5 kDa und einer Länge von 157 Aminosäuren. TNF-α zeigt ein breites Spektrum von biologischen Aktivitäten. Es verursacht Zytolyse und/oder Zytostase vieler Tumorzellen *in vitro*. Innerhalb von Stunden nach der Injektion führt TNF-α zur Zerstörung kleiner Blutgefäße in bösartigen Tumoren. Es erhöht die Phagozytose und Zytotoxizität neutrophiler Granulozyten und moduliert die Expression vieler anderer Proteine.

Bei Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder rheumatoider Arthritis werden erhöhte TNF-α-Serumwerte gefunden.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9610	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 9610	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10 x	1 x 100 ml
K 9610	AB	Antikörperkonzentrat (Maus anti-hTNF-α, biotinyliert)	1 x 150 µl
K 9610	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidasemarkiert	1 x 200 µl

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 9610	STDKONZ	Standardkonzentrat, lyophilisiert (Konzentration der Spezifikation entnehmen)	3 x 1 vial
K 9610	CTRL 1	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	3 x 1 vial
K 9610	CTRL 2	Kontrolle, lyophilisiert (Bereich der Spezifikation entnehmen)	3 x 1 vial
K 9610	STDBUF	Standardverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 25 ml
K 9610	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9610	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Stuhlprobenaufbereitungssystem wie z.B. Artikel-Nr. K 6998SAS
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 3 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Vorbereitung des Antikörpers:** Das **Antikörperkonzentrat (AB)** wird vor Gebrauch **1:101** in **Waschpuffer** verdünnt (z. B. 100 µl AB + 10 ml Waschpuffer). Das AB ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Antikörper** (1:101 verdünntes AB) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101** in **Waschpuffer** verdünnt (z. B. 100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- **Die lyophilisierten Kontrollen (CTRL)** sind bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **Rekonstitutionsvorgaben** sind dem **Spezifikationsdatenblatt** zu entnehmen. **Kontrollen** (rekonstituierte CTRL) **sind nicht stabil und können nicht gelagert werden.**
- **Das lyophilisierte Standardkonzentrat (STDKONZ)** ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **Rekonstitutionsvorgaben sowie das Verdünnungsschema** mit sich hieraus ergebenden Konzentrationen zur Herstellung der **Standardkurve** sind dem **Spezifikationsdatenblatt** zu entnehmen. Die **Standardkurve** (rekonstituiertes und verdünntes STDKONZ) **ist nicht stabil und kann nicht gelagert werden.**
-

- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Probenlagerung

Stuhlproben

Stuhlproben müssen **nach der Abnahme** (spätestens zwei Stunden danach) bei **-20 °C** tiefgefroren werden. Der Versand der Proben darf ebenfalls nur tiefgefroren erfolgen. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Serum-/Plasmaproben

Serum- bzw. Plasmaproben werden unverdünnt eingesetzt. Das Probenmaterial wird bis zur Verwendung bei **-20 °C** gelagert.

Stuhlprobenextraktion

Waschpuffer (1:10 verdünntes WASHBUF) wird als **Probenextraktionspuffer** verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

Stuhlprobenaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)

Stuhlprobenröhrchen - Anwendung

Bitte beachten Sie, dass der Verdünnungsfaktor der Stuhlsuspension von der aufgenommenen Stuhlmenge und dem Puffervolumen abhängig ist:

SAS mit 0,75 ml Probenextraktionspuffer:

Aufgenommene Stuhlmenge:	15 mg
Puffervolumen:	0,75 ml
Verdünnungsfaktor:	1:50

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe des SAS wird wie folgt durchgeführt:

a) Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.

b) Das **unbefüllte Stuhlprobenröhrchen** vor der Verwendung mit **0,75 ml Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) **befüllen**. **Wichtig:** Probenextraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!

c) Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstechen in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.

d) Das Röhrchen solange vortexen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. Für die Erhebung valider Messwerte ist darauf zu achten, dass die Stuhlsuspension nach dem Mischungsprozess eine möglichst homogene Konsistenz aufweist. Bei besonders festen Stühlen kann die Homogenität der Suspension durch längeres Einweichen (ca. 10 min) des Stuhls in Probenextraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.

e) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u. Ä. können hierbei vernachlässigt werden.

f) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlprobenröhrchens (blauer Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Beim Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

Verdünnung **1:50**

100 µl der **Verdünnung** werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von humanem TNF-α.

In diesem Assay wird TNF-α an auf die Mikrotiterplatte fixierte monoklonale Antikörper gebunden. Nach einem Waschschritt erfolgt die Zugabe eines biotinylierten Antikörpers, nach einem weiteren Waschschritt die Zugabe eines peroxidasemarkierten Konjugats. Als Substrat für die Peroxidase wird TMB eingesetzt. Die gebildete chromogene Verbindung kann photometrisch bei 450 nm gemessen werden. Die Absorption ist dem TNF-α-Gehalt direkt proportional. Anhand der mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15–30 °C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automatenspezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die Vertiefungen **vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer** waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	**100 µl Standards/Kontrollen/Proben** in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und **2 Stunden** bei Raumtemperatur (15–30 °C) **unter Schütteln*** inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und **5 x mit je 250 µl Waschpuffer** waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	**100 µl Antikörper** (verdünntes AB) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und **1 Stunde** bei Raumtemperatur (15–30 °C) **unter Schütteln*** inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und **5 x mit je 250 µl Waschpuffer** waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	**100 µl Konjugat** (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	Streifen abdecken und **1 Stunde** bei Raumtemperatur (15–30 °C) **unter Schütteln*** inkubieren.

10.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und **5 x mit je 250 µl Waschpuffer** waschen. Nach dem letzten Waschschritt Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
11.	**100 µl Substrat** (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
12.	**10–20 min**** bei Raumtemperatur (15–30 °C) **im Dunkeln** inkubieren.
13.	**100 µl Stopplösung** (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen
14.	**Extinktion sofort** im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei **405 nm** gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* Wir empfehlen die Streifen bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.

** Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Stuhlproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 50** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Serum- und Plasmaproben

Die tatsächliche Konzentration kann direkt aus den ermittelten Ergebnissen abgelesen werden (Verdünnungsfaktor 1).

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) müssen stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (Definition siehe unten) können nicht klar quantifiziert werden.

Die Obergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

höchste Konzentration der Standardkurve × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

Die Untergrenze des Messbereichs ergibt sich aus:

Analytische Sensitivität × *anzuwendender Probenverdünnungsfaktor*

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Anhand einer laborinternen Studie mit Plasmaproben von augenscheinlich Gesunden (n = 40) wurde ein Normwert von <20 pg/ml ermittelt.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 20)

Die Reproduzierbarkeit eines Ergebnisses innerhalb einer Messserie wurde geprüft. Eine Plasmaprobe wurde 20-mal im *IDK*® TNF-α-ELISA von einer Person angesetzt.

Probe	TNF-α-Mittelwert [pg/ml]	VK [%]
1	155	6,3

Inter-Assay (n = 20)

Die Reproduzierbarkeit eines Ergebnisses an unterschiedlichen Tagen wurde geprüft. Eine Serumprobe wurde an verschiedenen Tagen und von verschiedenen Personen im *IDK*® TNF-α-ELISA gemessen.

Probe	TNF-α-Mittelwert [pg/ml]	VK [%]
1	142	8,2

Analytische Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze wurde festgelegt als B_0 + 2 SD. Sie beträgt 10 pg/ml.

Spezifität

GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor)	< 10 %
M-CSF (Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor)	< 10 %
G-CSF (Granulozytenkolonie-stimulierender Faktor)	< 10 %

Linearität

Die Linearität dieses Tests wurde durch das Verdünnen von TNF-α-haltigem Material ermittelt. Der lineare Bereich erstreckt sich von 10–500 pg/ml.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- *IDK*® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. Beutler, B. & Cerami, A., 1988. The history, properties, and biological effects of cachectin. *Biochemistry*, **27**(20), pp.7575–82.
2. Chen, G. & Goeddel, D. V, 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science (New York, N.Y.),* **296**(5573), pp.1634–5.
3. Locksley, R.M., Killeen, N. & Lenardo, M.J., 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, **104**(4), pp.487–501.
4. Swardfager, W. et al., 2010. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biological psychiatry*, **68**(10), pp.930–41.
5. Vilcek, J. & Lee, T.H., 1991. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *The Journal of biological chemistry*, **266**(12), pp.7313–6.
6. Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P., 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation*, **10**(1), pp.45–65.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung

In-Vitro-Diagnostikum

Hersteller

Chargenbezeichnung

Achtung

Bestellnummer

Zu verwenden mit

Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen

Verwendbar bis

Gebrauchsanweisung beachten

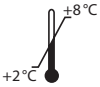
Manual

IDK® TNFα ELISA

For the in vitro determination of TNFα in serum, plasma, stool and cell culture supernatant

Valid from 2017-10-19

REF K 9610



IVD CE

Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
Tel.: +49 6251 70190-0 Fax: + 49 6251 849430
e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE 17

2. INTRODUCTION 17

3. MATERIAL SUPPLIED 17

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED 18

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS 18

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES 19

Sample storage 19
Extraction of the stool samples 20

7. ASSAY PROCEDURE 21

Principle of the test 21
Test procedure 21

8. RESULTS 22

9. LIMITATIONS 23

10. QUALITY CONTROL 23

Reference range 24

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS 24

Precision and reproducibility 24
Analytical Sensitivity 24
Linearity 24
Specificity 25

12. PRECAUTIONS 25

13. TECHNICAL HINTS 25

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE 26

15. REFERENCES 26

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of TNFα in plasma, serum, stool and cell culture supernatant. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Tumor necrosis factor-alpha (TNFα) is a cytokine involved in systemic inflammation. The primary role of TNFα is in the regulation of immune cells. TNFα stimulates the acute phase reaction, induces apoptotic cell death, cellular proliferation and differentiation, inhibits tumor genesis and viral replication. Dysregulation of TNFα production has been implicated in a variety of human diseases like cancer and Alzheimer.

TNFα is secreted by macrophages, monocytes, neutrophils, T-cells as well as natural killer cells following their stimulation by bacterial lipopolysaccharides. Human TNFα is a non-glycosylated protein with a molecular weight of 17.5 kDa and a length of 157 amino acids. TNFα shows a wide spectrum of biological activities. It causes cytolysis and/or cytostasis of many tumor cell lines *in vitro*. Within hours after injection, TNFα leads to destruction of small blood vessels within malignant tumors. TNFα enhances phagocytosis and cytotoxicity in neutrophilic granulocytes and modulates the expression of many other proteins.

Elevated TNFα serum levels are found in patients suffering from Crohn's disease, ulcerating colitis or rheumatoid arthritis.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9610	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 9610	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10 x	1 x 100 ml
K 9610	AB	Antibody concentrate (mouse anti-human-TNF-α, biotinylated)	1 x 150 µl
K 9610	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled	1 x 200 µl
K 9610	STDKONZ	Standard concentrate, lyophilised (see specification for concentration)	3 x 1 vial
K 9610	CTRL 1	Control, lyophilised (see specification for range)	3 x 1 vial

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9610	CTRL 2	Control, lyophilised (see specification for range)	3 x 1 vial
K 9610	STDBUF	Standard dilution buffer, ready-to-use	1 x 25 ml
K 9610	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 9610	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Stool sample application system such as Cat. No.: K 6998SAS
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 3 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redis-

solved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.

- **Preparation of the antibody:** Before use, the **antibody concentrate (AB)** has to be diluted **1:101** in wash buffer (e. g. 100 µl AB+ 10 ml wash buffer). The AB is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Antibody** (1:101 diluted CONJ) **is not stable and cannot be stored.**
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in wash buffer (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The CONJ is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:101 diluted CONJ) **is not stable and cannot be stored.**
- The **lyophilised controls (CTRL)** are stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Reconstitution** details are given in the **specification data sheet**. **Controls** (reconstituted CTRL) **are not stable and cannot be stored.**
- The **lyophilised standard concentrate (STDKONZ)** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Reconstitution** details**, dilution scheme** and the resulting concentrations needed to prepare a **calibration curve** are given in the **specification data sheet**. **Standards** (reconstituted and diluted STDKONZ) **are not stable and cannot be stored.**
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Sample storage

Stool samples

For TNFα measurement in stool, please freeze the stool samples at **-20 °C** immediately after collection (not later than two hours after collection). If samples have to be transported, please make sure to keep them frozen.

Serum and plasma samples

Serum/plasma can be used without further dilution. Samples have to be stored at **-20 °C**.

Extraction of the stool samples

Wash buffer (1:10 diluted WASHBUF) is used as a **sample extraction buffer**. We recommend the following sample preparation:

Stool Sample Application System (SAS) (Cat. No.: K 6998SAS)

Stool sample tube – Instructions for use

Please note that the dilution factor of the final stool suspension depends on the amount of stool sample used and the volume of the buffer.

SAS with 0.75 ml sample extraction buffer:

Applied amount of stool:	15 mg
Buffer Volume:	0.75 ml
Dilution Factor:	1:50

Please follow the instructions for the preparation of stool samples using the SAS as follows:

a) The raw stool sample has to be thawed. For particularly heterogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.

b) Fill the **empty stool sample tube** with **0.75 ml wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) before using it with the sample. **Important:** Allow the sample extraction buffer to reach room temperature.

c) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert the yellow dipstick into the sample. The lower part of the dipstick has notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped off, leaving 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.

d) Shake the tube well until no stool sample remains in the notches. Important: Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Allow sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.

e) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the blue ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

Dilution I: 1:50

For analysis, pipet **100 µl** of the **dilution** per well.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of TNFα.

In a first incubation step, TNFα is bound to monoclonal antibodies, which are immobilised on the surface of the microtiter plate. After a washing step to remove all interfering substances, a biotinylated antibody is added. After another washing step, a horseradish peroxidase-labelled conjugate is added. The amount of the converted substrate by the peroxidase is directly proportional to the amount of bound TNFα and can be determined photometrically at 450 nm. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. TNFα, present in the samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30 °C) and mix well.

Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips covered at 2–8 ° C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	**Before use**, wash the wells **5 times** with **250 µl wash buffer**. After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each **100 µl standards/controls/samples** into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for **2 hours** at room temperature (15–30 °C) on a **horizontal shaker***.
4.	Discard the content of each well and wash **5 times** with **250 µl wash buffer**. After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add **100 µl antibody** (diluted AB) into each well.
6.	Cover the strips and incubate for **1 hour** at room temperature (15–30 °C) on a **horizontal shaker***.

7.	Discard the content of each well and wash **5 times** with **250 µl wash buffer**. After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add **100 µl conjugate** (diluted CONJ) into each well.
9.	Cover the strips and incubate for **1 hour** at room temperature (15–30 °C) on a **horizontal shaker***.
10.	Discard the content of each well and wash **5 times** with **250 µl wash buffer**. After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
11.	Add **100 µl substrate** (SUB) into each well.
12.	Incubate for **10–20 min**** at room temperature (15–30 °C) in the **dark**.
13.	Add **100 µl stop solution** (STOP) into each well and mix well.
14.	Determine **absorption immediately** with an ELISA reader at **450 nm** against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at **405 nm** against 620 nm as a reference.

* We recommend shaking the strips at 550 rpm with an orbit of 2 mm.

** The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour change and stopping the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the 4 parameter algorithm.

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

Stool samples

The obtained results have to be multiplied with the **dilution factor of 50** to get the actual concentrations.

Serum/plasma samples

The actual concentration can be read directly from the results determined (dilution factor 1).

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result with the dilution factor used.

9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range (see definition below) must be further diluted and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (see definition below) cannot be clearly quantified.

The upper limit of the measurement range can be calculated as:

highest concentration of the standard curve × *sample dilution factor to be used*

The lower limit of the measurement range can be calculated as:

Analytical sensitivity × *sample dilution factor to be used*

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

Reference range

Based on Immundiagnostik AG studies of plasma samples of apparently healthy persons (n = 40), a normal value of <20 pg/ml was estimated.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 20)

The reproducibility of a result in one measurement series was evaluated. One plasma sample was analysed 20 times by one person using the *IDK*® TNFα ELISA.

Sample	TNFα mean [pg/ml]	CV [%]
1	155	6.3

Inter-Assay (n = 20)

The reproducibility of a result at different days was evaluated. One serum sample was analysed at different days by different persons using the *IDK*® TNFα ELISA.

Sample	TNFα mean [pg/ml]	CV [%]
1	142	8.2

Analytical Sensitivity

The detection limit was set as B_0 + 2 SD and estimated to be 10 pg/ml.

Linearity

Linearity of the test was evaluated by dilution of TNFα-containing material. Linearity was obtained in the range of 10–500 pg/ml.

Specificity

GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)	< 10 %
M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor)	< 10 %
G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor)	< 10 %

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiry date stated on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- *IDK*® is a trademark of Immundiagnostik AG.

- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Beutler, B. & Cerami, A., 1988. The history, properties, and biological effects of cachectin. *Biochemistry*, **27**(20), pp.7575–82.
2. Chen, G. & Goeddel, D. V, 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science (New York, N.Y.),* **296**(5573), pp.1634–5.
3. Locksley, R.M., Killeen, N. & Lenardo, M.J., 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, **104**(4), pp.487–501.
4. Swardfager, W. et al., 2010. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biological psychiatry*, **68**(10), pp.930–41.
5. Vilcek, J. & Lee, T.H., 1991. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *The Journal of biological chemistry*, **266**(12), pp.7313–6.
6. Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P., 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation*, **10**(1), pp.45–65.

Used symbols:

Temperature limitation

Catalogue Number

In Vitro Diagnostic Medical Device

To be used with

Manufacturer

Contains sufficient for <n> tests

Lot number

Use by

Attention

Consult instructions for use