

Arbeitsanleitung/Manual

# TNF $\alpha$ ELISA Kit

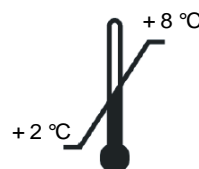
*Zur in vitro Bestimmung des TNF  $\alpha$  in Serum, Plasma, Stuhl und Zellkulturüberständen*

*For the in vitro determination of TNF  $\alpha$  in serum, plasma, stool and cell culture supernatant*

Gültig ab / Valid from 07.12.2007



K 9610



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim  
Tel.: ++49 6251 70190-0  
Fax: ++ 49 6251 849430  
e.mail: [Info@immundiagnostik.com](mailto:Info@immundiagnostik.com)  
[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

---

Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
Table of content	2
<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>3</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>3. TESTPRINZIP</b>	<b>3</b>
<b>4. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>4</b>
<b>5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>4</b>
<b>6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>5</b>
<b>7. HINWEISE UND VORSICHTSMABNAHMEN</b>	<b>6</b>
<b>8. PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>7</b>
<b>9. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>7</b>
HINWEISE	7
PIPETTIERSHEMA	8
<b>10. ERGEBNISSE</b>	<b>9</b>
MUSTEREICHKURVE	9
<b>11. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>10</b>
<b>12. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>10</b>
ERWARTETE ERGEBNISSE	10
<b>13. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>11</b>
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	11
SENSITIVITÄT	11
KREUZREAKTIVITÄT	11
LINEARITÄT	12
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>12</b>

Table of content	Page
<b>1. INTENDED USE</b>	<b>15</b>
<b>2. CLINICAL RELEVANCE</b>	<b>15</b>
<b>3. TEST PRINCIPLE</b>	<b>15</b>
<b>4. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>16</b>
<b>5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>16</b>
<b>6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>17</b>
<b>7. PRECAUTIONS</b>	<b>18</b>
<b>8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION</b>	<b>19</b>
<b>9. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>20</b>
PROCEDURAL NOTES	20
TEST PROCEDURE	20
<b>10. RESULTS</b>	<b>22</b>
TYPICAL CALIBRATION CURVE	22
<b>11. LIMITATIONS</b>	<b>23</b>
<b>12. QUALITY CONTROL</b>	<b>23</b>
EXPECTED VALUES	23
<b>13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>24</b>
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	24
SENSITIVITY	24
CROSS REACTIVITY	24
LINEARITY	25
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>25</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **TNF- $\alpha$**  aus Serum, Plasma, Stuhl und Zellkulturüberständen geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

Der septische Schock ist eine ernste lebensbedrohende Erkrankung. Trotz verbesserter Antibiotika-Therapie und Patientenüberwachung liegt die Sterblichkeitsrate zwischen 40 und 90 %. Die Diagnose des septischen Schocks basiert zur Zeit auf klinischen Beobachtungen und verschiedenen Laboruntersuchungen. Der septische Schock ist durch Hypotonie, Fieber, Atmungsstörungen, Tachykardie, abnorme Leukozytenzahl und Nieren- oder Leberversagen gekennzeichnet.

Einige dieser klinischen Symptome werden hauptsächlich durch Endotoxinproduzierende gram-negative Bakterien und von endogenen Faktoren, insbesondere Zytokinen, verursacht. Ihre biologische Konzentration liegt im pMol-Bereich.

**TNF- $\alpha$**  ist in physiologischer Konzentration ein Mediator für Immun- und Entzündungsreaktionen. **TNF- $\alpha$**  aktiviert Makrophagen und erhöht die Zytotoxizität von Monozyten und NK-Zellen. Bei einer überschießenden Abwehrreaktion im Rahmen einer Infektion kommt es zu einer Überproduktion von **TNF- $\alpha$** , die einen septischen Schock mit tödlichem Ausgang hervorrufen kann.

Bei Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa findet man erhöhte Serum-TNF $\alpha$ -Werte.

## 3. TESTPRINZIP

Dieser Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Bestimmung des humanen **Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )**. In diesem Assay wird **TNF- $\alpha$**  aus den Proben an monoklonale, auf Mikrotiterplatten fixierte Antikörper gebunden. Die Quantifizierung des gebundenen TNF $\alpha$  erfolgt nach einem Waschvorgang durch Zugabe eines 2. monoklonalen Antikörpers und eines Peroxidase-markierten 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- $\alpha$**  Gehalt direkt proportional.

#### 4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 9610MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 9610WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	100 ml
K 9610A2	AB	2. Antikörper (Maus anti TNF- $\alpha$ , biotinyliert)	1 x 150 $\mu$ l
K 9610K	CONJ	Konjugat, (Streptavidin, Peroxidase- markiert)	1 x 200 $\mu$ l
K 9610ST	STD	Standardkonzentrat (1000 pg/ml), lyophilisiert	3 x 800 $\mu$ l
K 9610PV	STDBUF	Standardverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 25 ml
K 9610TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 9610AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

#### 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000  $\mu$ l
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

## 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, 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 als 100  $\mu$ l** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das WASHBUF (Pufferkonzentrat) kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Der **AB** (2. Antikörper) wird **1:101** mit Waschpuffer verdünnt (z.B. 100  $\mu$ l 2. Antikörper + 10 ml Waschpuffer). Unverdünnter Antikörper ist bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil (siehe Etikett). **Verdünnter Antikörper ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**
- Das **CONJ** (Konjugat, Streptavidin, Peroxidase-markiert) wird unmittelbar vor Gebrauch **1:101** in Waschpuffer verdünnt (z.B. 100  $\mu$ l Konjugat + 10 ml Waschpuffer). Unverdünntes **CONJ** ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden.**

- Der lyophilisierte **STD** (Standard) **1000 pg/ml** wird mit **800  $\mu$ l STDBUF** (Standardverdünnungspuffer) rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen mind. 10 Minuten stehen gelassen. Die weiteren Standards sind aus dem Standardkonzentrat (S=1000 pg/ml) **seriell durch 1:2 Verdünnungen in Standardverdünnungspuffer zu verdünnen:**

S 1 = **500  $\mu$ l S** + **500  $\mu$ l Standardverdünnungspuffer**

S 2 = **500  $\mu$ l S1** + **500  $\mu$ l Standardverdünnungspuffer**

S 3 = **500  $\mu$ l S2** + **500  $\mu$ l Standardverdünnungspuffer**

S 4 = **500  $\mu$ l S3** + **500  $\mu$ l Standardverdünnungspuffer**

S 5 = **500  $\mu$ l S4** + **500  $\mu$ l Standardverdünnungspuffer**

S 6 = **500  $\mu$ l S5** + **500  $\mu$ l Standardverdünnungspuffer**

**Als Standard 0 wird der Standardverdünnungspuffer verwendet.**

Rekonstituierte Standards können nicht gelagert werden.

- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Standards und Kontrollen sind auf Humanserum aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befunden worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht behandelt werden. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

## 8. PROBENVORBEREITUNG

### Stuhl

Ca. **100 mg** Stuhl einwiegen und die genau eingewogene Stuhlmenge notieren und in **5 ml** des Waschpuffers lösen (sehr gut mischen). Danach wird die Suspension für 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. 1 ml des Überstandes wird abgenommen, in ein Eppendorfröhrchen überführt und ein weiteres Mal in einer Eppendorfzentrifuge bei 13000 rpm für 5 min. zentrifugiert. Der erhaltene Überstand kann nicht aufbewahrt werden.

Der Überstand wird vor jedem Testansatz für **2 Minuten** bei 13000 rpm in der Eppendorfzentrifuge zentrifugiert. Von dieser Endverdünnung werden dann **100  $\mu$ l** in den Test eingesetzt.

Zur einfacheren Dosierung und Homogenisierung des Probenmaterials empfehlen wir das Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim (Best. Nr. 745804).

### HINWEIS:

Für die Bestimmung von TNF- $\alpha$  aus Stuhl weisen wir darauf hin, dass Stuhlproben unbedingt nach der Abnahme (Spätestens 2h danach) bei -20 °C tiefgefroren werden müssen. Der Versand der Proben darf ebenfalls nur tiefgefroren erfolgen. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Weiterhin empfehlen wir die Stabilität von TNF- $\alpha$  in Stuhlproben zu überprüfen, bevor der Test in der Routine eingesetzt wird.

### Serum/Plasma

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

## 9. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Hinweise*

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.

### *Pipettierschema*

Vor Gebrauch Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (18-26°C) bringen und gut mischen. Direktes Licht während der Inkubationsschritte vermeiden. Mikrotiterstreifen während den Inkubationen mit Folie abdecken. Die Bestimmungen in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchführen.

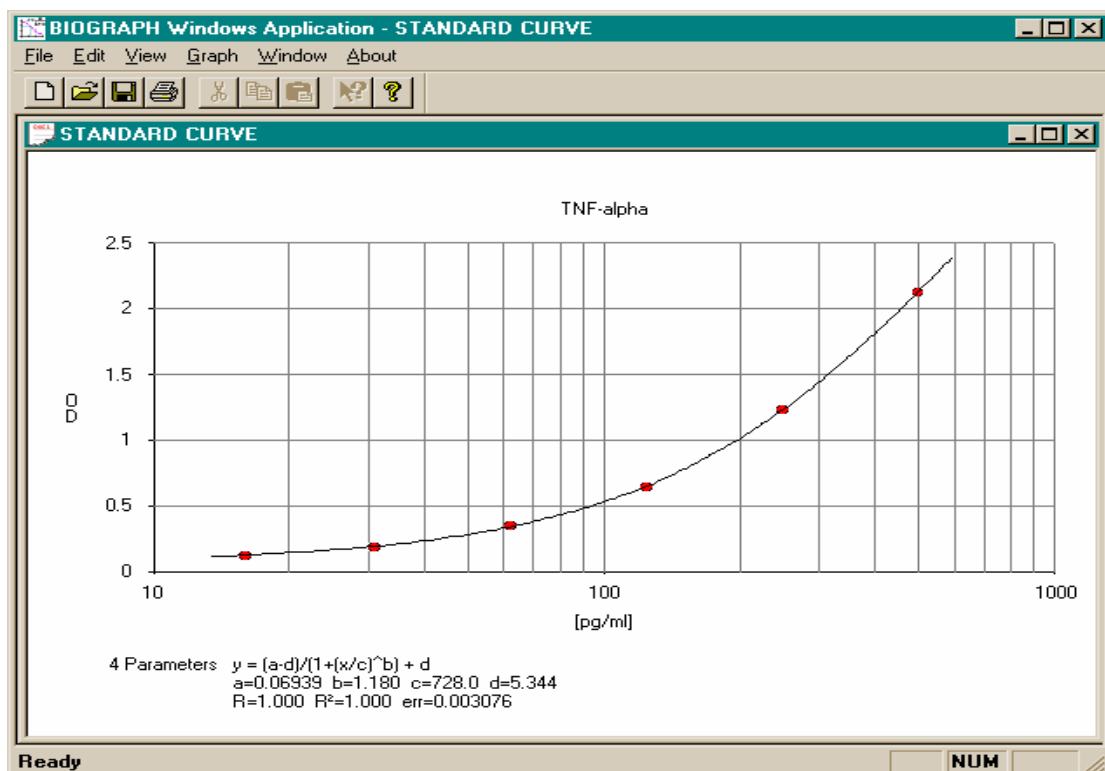
Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte vor Gebrauch **5x mit je 250  $\mu$ l** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

1. **100  $\mu$ l STD** (Standard) oder **SAMPLE** (Probe) in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
2. **2 Stunden** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
3. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250  $\mu$ l** verdünnter Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
4. **100  $\mu$ l** verdünnter **AB** (2. Antikörperlösung, biotinylierter 2. Antikörper) pro Vertiefung pipettieren.
5. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
6. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250  $\mu$ l** verdünnter Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
7. **100  $\mu$ l** vorverdünntes **CONJ** (Konjugat, Streptavidin, Peroxidase-markiert) pro Vertiefung pipettieren.
8. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln, im Dunklen inkubieren.
9. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250  $\mu$ l** verdünnter Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
10. **100  $\mu$ l SUB** (Substrat) in jede Vertiefung pipettieren.
11. **10-20 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren bis ausreichend große Farbdifferenzen auftreten.
12. **50  $\mu$ l STOP** (Stopplösung) in jede Vertiefung pipettieren.
13. **Extinktion sofort** im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Sollte die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigen, sofort bei 405 nm gegen 620 nm (oder 690 nm) messen.

## 10. ERGEBNISSE

Zur Auswertung des Testes empfehlen wir die 4-Parameter-Funktion. Alternativ kann auch eine Punkt-zu-Punkt-Auswertung oder eine gewichtete Spline-Funktion gewählt werden. Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte diese der Operator durchführen.

### *Mustereichkurve*



Konzentration [pg/ml]	16	31	62	125	250	500
OD Mittelwert	0.127	0.191	0.348	0.651	1.235	2.131

Die hier aufgeführten Ergebnisse sind ein Beispiel für eine Standardkurve. Sie dürfen nicht für die Auswertung des Assays verwendet werden.

**Stuhlproben:**

Die ermittelte TNF- $\alpha$  Konzentration der Stuhlprobe wird wie im folgenden Beispiel berechnet:

Einwaage: 80 mg (1ml Stuhl = 1g) = 0.08 ml

Verdünnungsstufe: 5ml / 0.08ml = 62.5

Verdünnungsfaktor: 62.5

Die ermittelte Stuhlkonzentration wird mit **62.5** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen. **Der Faktor ändert sich mit der Einwaage der Stuhlprobe.**

**11. EINSCHRÄNKUNGEN**

Proben mit einer TNF- $\alpha$  Konzentration größer dem größten Standard sollten verdünnt werden und nochmals im Assay eingesetzt werden.

**12. QUALITÄTSKONTROLLE**

Für die Qualitätskontrolle empfehlen wir die Verwendung unabhängiger externer Kontrollen.

*Erwartete Ergebnisse***Normwerte:**

Plasma (Gesunde Personen, n = 40):

TNF $\alpha$  < 20 pg/ml

## 13. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Präzision und Reproduzierbarkeit*

#### Intra-Assay-Variation

Die Reproduzierbarkeit von einer Probe innerhalb einer Meßserie wurde geprüft. Eine Normalprobe und eine pathologische Probe wurden 20 mal in einem TNF $\alpha$  ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay VK n= 20

Probe	TNF $\alpha$ Mittelwert [pg/ml]	Intra-Assay Vk [%]
1	155	6.3

#### Inter-Assay-Variation

Es wird die Reproduzierbarkeit von einer Probe an unterschiedlichen Tagen geprüft. Eine Normalprobe wurden an verschiedenen Tagen und verschiedenen Personen im TNF $\alpha$  ELISA gemessen.

Inter-Assay VK n= 20

Probe	TNF $\alpha$ Mittelwert [pg/ml]	Inter-Assay Vk [%]
1	142	8.2

### *Sensitivität*

Die Nachweisgrenze dieses TNF  $\alpha$  ELISA´s wurde festgesetzt als  $B_0 + 2SD$ . Sie beträgt 10 pg/ml.

### *Kreuzreaktivität*

GM-CSF < 0.1

M-CSF < 0.1

G-CSF < 0.1

### Linearität







Die Linearität dieses Testes wurde durch Verdünnen von TNF $\alpha$ -haltigem Material mit Verdünnungspuffer ermittelt. Der lineare Bereich erstreckt sich von 10 - 500 pg/ml.

## 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Falls für die Herstellung der Testkomponenten Humansenen verwendet wurde, sind diese auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befunden worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Testkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid/ Thimerosal sind giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Datums nicht mehr verwendet werden. Einzelkomponenten verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die, für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik 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 zurück zu senden.

07.12.2007 07.12.2007\_TNF-alpha

**Verwendete Symbole:**

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Hersteller		Verwendbar bis
	Chargenbezeichnung		

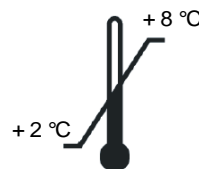
# TNF $\alpha$ ELISA Kit

*For the in vitro determination of TNF  $\alpha$  in serum, plasma, stool  
and cell culture supernatant*

Valid from 07.12.2007



K 9610



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim  
Tel.: ++49 6251 70190-0  
Fax: ++ 49 6251 849430  
e.mail: [Info@immundiagnostik.com](mailto:Info@immundiagnostik.com)  
[www.Immundiagnostik.com](http://www.Immundiagnostik.com)

## 1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is a sandwich Enzyme Immuno Assay intended for the quantitative determination of TNF  $\alpha$  in plasma, serum, stool and cell culture supernatant. For *in vitro* diagnostic use only.

## 2. CLINICAL RELEVANCE

TNF- $\alpha$  (tumor-necrosis-factor-alpha) belongs to the group of pro-inflammatory cytokines with cytotoxic activity. Activated monocytes/macrophages, lymphocytes and natural killer cells as well as many other malignant cells and mast cells are capable of producing TNF- $\alpha$ .

Recent studies using antibodies against TNF- $\alpha$  such as the "ATTRACT study - Anti TNF Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy" confirm that TNF- $\alpha$  in the case of rheumatoid arthritis plays a key pathogenic role. TNF- $\alpha$  is produced by macrophages in the synovial tissue once the inflammatory macrophages have infiltrated the mucus membrane of the joints. There, TNF- $\alpha$  activates the fibroblasts to proliferate, induces vascular growth and stimulates the macrophages in a positive feedback reaction for further production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 and IL-6 and stimulates thereby the inflammatory processes of the joints. Altogether, these mechanisms play an important role in the destruction of inflamed joints.

## 3. TEST PRINCIPLE

This Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) allows the quantitative determination of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . In a first incubation step, TNF $\alpha$  in the samples is bound to monoclonal mouse antibodies against TNF $\alpha$ , which are immobilized on the surface of the microtiter plate. After a washing step, to remove all interfering substances, the quantification of the bound TNF $\alpha$  is carried out by adding of a second monoclonal anti TNF $\alpha$  antibody and a horseradish peroxidase labeled conjugate. The amount of the converted substrate by the peroxidase is directly proportional to the amount of bound TNF  $\alpha$  and can be determined photometrically at 450 nm.

#### 4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Content	Kit Components	Quantity
K 9610MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 9610WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	100 ml
K 9610A2	AB	2 <sup>nd</sup> Antibody (Mouse anti hTNF- $\alpha$ , biotinylated)	1 x 150 $\mu$ l
K 9610K	CONJ	Conjugate, (Streptavidin Peroxidase- labeled)	1 x 200 $\mu$ l
K 9610ST	STD	Calibrator concentrate (1000 pg/ml), lyophilized	3 x 800 $\mu$ l
K 9610PV	STDBUF	sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 25 ml
K 9610TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 9610AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

#### 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Laboratory balance
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000  $\mu$ l
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 or 405 nm  
(reference wave length 620 or 690 nm)

## 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 3 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100  $\mu$ l** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml concentrate + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved in a water bath at 37°C before dilution. The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month.**
- The **AB** (2<sup>nd</sup> antibody) is diluted **1:101** in wash buffer (100  $\mu$ l **2<sup>nd</sup> antibody** + 10 ml wash buffer). Undiluted antibody is stable at 2-8°C until the expiry date given on the label. **Diluted antibody solution is not stable and can not be stored.**
- The **CONJ** (conjugate, Streptavidin Peroxidase-labeled) must be diluted **1:101** in wash buffer (100  $\mu$ l **CONJ** + 10 ml wash buffer). The undiluted conjugate is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and can not be stored.**

- The lyophilized **STD** (standard) **1000 pg/ml** must be reconstituted with **800  $\mu$ l STDBUF** (standard dilution buffer). Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. For the **TNF- $\alpha$**  calibration curve dilute the concentrate (S=1000 pg/ml) in **1:2 dilution steps in standard dilution buffer** as described in the following example:

S 1 = **500  $\mu$ l S** + **500  $\mu$ l** standard dilution buffer

S 2 = **500  $\mu$ l S1** + **500  $\mu$ l** standard dilution buffer

S 3 = **500  $\mu$ l S2** + **500  $\mu$ l** standard dilution buffer

S 4 = **500  $\mu$ l S3** + **500  $\mu$ l** standard dilution buffer

S 5 = **500  $\mu$ l S4** + **500  $\mu$ l** standard dilution buffer

S 6 = **500  $\mu$ l S5** + **500  $\mu$ l** standard dilution buffer

**As zero standard use the standard dilution buffer.**

Reconstituted standard is **not stable** and can not be stored.

- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C**.

## 7. PRECAUTIONS

- 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 thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.

## 8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

### Faeces

The test can be performed on either fresh or frozen stool samples. The samples should be refrigerated and could be stored at 2-8°C for 2 days. If the test cannot be performed within this period the specimen should be stored at -20°C or colder.

Add a stool sample of about 100 mg (size of a pea, please note the exact weight for the calculation) to 5 ml of the ELISA wash buffer and homogenize very thoroughly for 15 seconds on a Vortex-mixer. Centrifuge the suspension for 10 min at 3000 rpm. 1 ml of the supernatant is given into an Eppendorf tube and centrifuged once more at 13,000 rpm for 5 min. This supernatant could be stored at -20°C for about 1 month. **100  $\mu$ l** of this supernatant is used in the assay.

*Immundiagnostik* recommends the use of Roche Diagnostics / Mannheim sample preparation tubes, article No. 745804, for sample preparation.

### PLEASE NOTE:

For TNF- $\alpha$  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. The stability of the samples must be checked before using the method in routine.

### Serum, plasma

Collection and storage of **serum**: Collect sufficient blood (at least 1 ml) by venipuncture into a tube or a plastic syringe, avoid hemolysis, centrifuge for 15 minutes at 1,000 x g and 4°C and collect the serum.

Collection and storage of **plasma**: Collect sufficient blood (at least 1 ml) by venipuncture into an EDTA venipuncture tube or a plastic syringe, centrifuge for 15 minutes at 1,000 x g and 4°C within 10 minutes after blood collection and separate the plasma from the cells.

Serum/Plasma can be used without further dilution. Samples must be stored at -20 °C.

## 9. ASSAY PROCEDURE

### *Procedural notes*

- Do not mix different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure, that are not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik can therefore not be held responsible for any damage.
- Carry out the assay with the actual manual delivered with the kit.

### *Test procedure*

Bring all reagents to room temperature (18-26°C) and mix well before use. Avoid direct sun light during all incubation steps. Cover the microtiter plate during the different incubation steps. Carry out the tests in duplicate.

Wash the precoated microtiter plate **5 x with 250  $\mu$ l** ELISA wash buffer before use. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.

1. Add **100  $\mu$ l STD** (Standard) or **SAMPLE** (Sample) into respective well.
2. Incubate for **2 hours**, shaking on a horizontal mixer, at room temperature.
3. Decant the contents of the plate and wash the cavities **5 x with 250  $\mu$ l** of washing buffer solution. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.
4. Add **100  $\mu$ l** diluted **AB** (2. antibody, Mouse anti hTNF- $\alpha$ , biotinylated) solution.
5. Incubate for **1 hour** on plate shaker at room temperature.

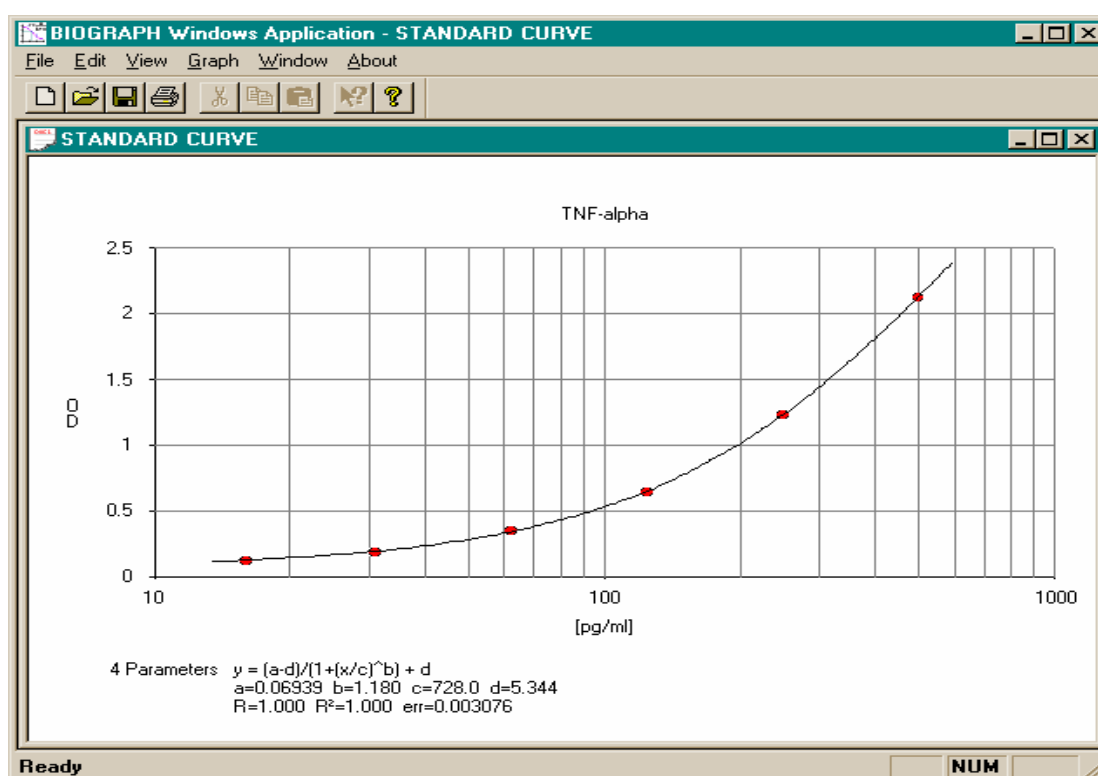
6. Decant the contents of the plate and wash the cavities **5 x with 250  $\mu$ l** of washing buffer solution. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.
7. Add **100  $\mu$ l** pre-diluted **CONJ** (Streptavidin Peroxidase-labeled).
8. Incubate for **1 hour**, shaking on a horizontal mixer, at room temperature in the dark.
9. Decant the contents of the plate and wash the cavities **5 x with 250  $\mu$ l** of washing buffer solution. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.
10. Add **100  $\mu$ l SUB** (TMB substrate).
11. Incubate for **10-20 minutes** at room temperature.
12. Add **50  $\mu$ l STOP** (stop solution) and mix shortly.
13. Determine **absorption immediately** with an ELISA reader at **450 nm** against 620 nm (or 690 nm) as reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the measurement range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm (or 690 nm) as reference.

## 10. RESULTS

A calibration curve is constructed from the standards. Commercially available software can be used as well as graph paper. Results of the samples are read from this calibration curve.

THE CALIBRATION CURVE IS NOT LINEAR, therefore a spline- or 4PL algorithm is recommended.

### *Typical calibration curve*



Concentration [pg/ml]	16	31	62	125	250	500
OD mean value	0.127	0.191	0.348	0.651	1.235	2.131

These data are for demonstration only and cannot be used instead of data obtained from the actual assay

## Faecal samples

To calculate the TNF  $\alpha$  concentration of faecal specimen see the following example:

weight: 80 mg (1ml stool = 1g) = 0.08 ml

dilution step: 5 ml / 0,08 ml = 62.5

dilution factor: 62.5

Multiply the results with the calculated dilution factor (in this case 62.5) to get the TNF  $\alpha$  concentration of the stool samples. **Please note:** the dilution factor depends on the weight of the used faecal specimen.

## 11. LIMITATIONS

Samples with TNF  $\alpha$  levels greater than the highest calibrator, should be diluted and re-assayed.

## 12. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends commercial control samples for internal quality control.

Control samples or serum pools should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. In assays in which one or more of the quality control sample values lie outside the acceptable limits, the results for the patient sample may not be valid.

### *Expected values*

Plasma (n=40): < 20pg/ml

## 13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Precision and reproducibility*

The precision (intra-assay variation) of the Immundiagnostik TNF  $\alpha$  ELISA test was calculated from 20 replicate determinations on each of one samples.

Intra-Assay CV n= 20

Sample	TNF $\alpha$ mean [pg/ml]	Intra-Assay CV [%]
1	155	6.3

### Inter-Assay-Variation

The total precision (inter-assay variation) of the Immundiagnostik TNF $\alpha$  ELISA test was calculated from data one sample obtained in 20 different assays by three technicians on two different lots of reagents over a period of three months.

Inter-Assay CV n= 20

Sample	TNF $\alpha$ mean [pg/ml]	Inter-Assay CV [%]
1	142	8.2

### *Sensitivity*

The detection limit of TNF  $\alpha$  ELISA 's is calculated as  $B_0 + 2SD = 10$  pg/ml.

### *Cross reactivity*

GM-CSF < 0.1

M-CSF < 0.1

G-CSF < 0.1

## Linearity

Linearity of the test was evaluated by dilution of TNF $\alpha$ -containing material. Linearity was obtained in the range of 10 - 500 pg/ml.

## 14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- For *in vitro* diagnostic use only.
- Quality control guidelines should be followed.
- 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 thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.
- 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 wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of 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.

**Used symbols:**



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number