

# TNF- $\alpha$ ELISA Kit

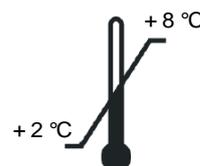
*Zur in vitro Bestimmung des TNF- $\alpha$  in Serum, Plasma, Stuhl und Zellkulturüberstand*

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

Gültig ab / Valid from 23.11.2012



**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 VORSICHTSMAßNAHMEN</b>	<b>6</b>
<b>8. PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>7</b>
<b>HINWEIS</b>	<b>8</b>
<b>9. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>8</b>
HINWEISE	8
PIPETTIERSHEMA	9
<b>10. ERGEBNISSE</b>	<b>10</b>
<b>11. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>11</b>
<b>12. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>11</b>
ERWARTETE ERGEBNISSE	11
<b>13. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>11</b>
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	11
SENSITIVITÄT	12
KREUZREAKTIVITÄT	12
LINEARITÄT	12
<b>14. LITERATUR</b>	<b>12</b>
<b>15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>13</b>

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>16</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>16</b>
<b>3. TEST PRINCIPLE</b>	<b>16</b>
<b>4. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>17</b>
<b>5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>17</b>
<b>6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>18</b>
<b>7. PRECAUTIONS</b>	<b>19</b>
<b>8. SAMPLE PREPARATION</b>	<b>20</b>
<b>PLEASE NOTE</b>	<b>21</b>
<b>9. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>21</b>
PROCEDURAL NOTES	21
TEST PROCEDURE	22
<b>10. RESULTS</b>	<b>23</b>
<b>11. LIMITATIONS</b>	<b>24</b>
<b>12. QUALITY CONTROL</b>	<b>24</b>
EXPECTED VALUES	24
<b>13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>24</b>
PRECISION AND REPRODUCIBILITY	24
SENSITIVITY	25
CROSS REACTIVITY	25
LINEARITY	25
<b>14. REFERENCES</b>	<b>25</b>
<b>15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>26</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

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

## 2. EINLEITUNG

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

TNF- $\alpha$  wird nach einer Stimulation durch bakterielle Lipopolysaccharide von Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen, T-Zellen sowie NK-Zellen (natürliche Killerzellen) sezerniert. Humanes TNF- $\alpha$  ist ein nichtglykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 17,5 kDa und einer Länge von 157 Aminosäuren. TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  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 Serum-TNF- $\alpha$ -Werte gefunden.

## 3. TESTPRINZIP

Dieser Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Bestimmung des humanen TNF- $\alpha$ . In diesem Assay wird TNF- $\alpha$  an auf die Mikrotiterplatte fixierte monoklonale Antikörper gebunden. Nach einem Waschvorgang erfolgt die 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	Mikrotiterplatte, beschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 9610WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	100 ml
K 9610A2	AB	2. Antikörper (Maus anti-hTNF- $\alpha$ , biotinyliert)	1 x 150 $\mu$ l
K 9610K	CONJ	Konjugat (Streptavidin, Peroxidase-markiert)	1 x 200 $\mu$ l
K 9610ST	STDKONZ	Standardkonzentrat, lyophilisiert	3 x 1 vial
K 9610KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	3 x 1 vial
K 9610KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert	3 x 1 vial
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

- Reinstwasser\*
- 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

\*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  $\mu$ m) mit einer elektrischen Leitfähigkeit < 0,055  $\mu$ S/cm bei 25°C ( $\geq$ 18,2 M $\Omega$  cm).

## 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfacher Verwendung des Testkits darauf, dass alle 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 Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), 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 bleibt bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil und kann verwendet 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 AB + 10 ml Waschpuffer). Unverdünnter Antikörper ist bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil (siehe Etikett). **Verdünnter Antikörper ist nicht stabil und darf nicht wiederverwendet werden.**
- Das **CONJ** (Konjugat) wird unmittelbar vor Gebrauch **1:101** in Waschpuffer verdünnt (z.B. 100  $\mu$ l CONJ + 10 ml Waschpuffer). Unverdünntes **CONJ** ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und darf nicht wiederverwendet werden.**
- Die lyophilisierten **CTRL** (Kontrollen) sind bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Die **CTRL** werden mit **500  $\mu$ l STDBUF** (Standardverdünnungspuffer) rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen mind. 10 Minuten stehen gelassen. **Rekonstituierte Kontrollen sind nicht stabil und dürfen nicht wiederverwendet werden.**

- Das lyophilisierte **Standardkonzentrat** (STDKONZ) wird mit **Standardverdünnungspuffer** (STDBUF) rekonstituiert und daraus durch serielle **1:2 Verdünnung** eine Kalibrierkurve erstellt. Das Rekonstitutionsvolumen sowie das Verdünnungsschema mit sich hieraus ergebenden Konzentrationen sind dem Spezifikationsdatenblatt zu entnehmen.

Das lyophilisierte **Standardkonzentrat** (STDKONZ) ist bei **2–8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil, **rekonstituiertes Konzentrat ist nicht stabil und kann 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 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

### Stuhlproben

#### Stuhlprobenextraktion

##### 1a. Stuhlaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)

###### **Stuhlröhrchen - Anwendung**

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

###### **SAS mit 0,75 ml Puffer:**

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

###### **Als Extraktionspuffer wird verdünnter Waschpuffer verwendet.**

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

- Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- Das **unbefüllte Stuhlröhrchen** vor der Verwendung mit **0,75 ml** gebrauchsfertigem Extraktionspuffer **befüllen**. Wichtig: Extraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- 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.
- Das Röhrchen solange mischen 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 Extraktionspuffer 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 Stuhlröhrchens (türkiser Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Bei dem Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

### **1b. Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim (Best. Nr. 10 745 804 322)**

Alternativ kann ein anderes Stuhlaufarbeitungssystem (z. B. Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet werden. Bei dem Roche Probenvorbereitungssystem werden 100 mg Stuhlprobe in 5 ml Extraktionspuffer mit Hilfe eines Vibrationsmischers (z. B. Vortex) homogenisiert. Anschließendes Zentrifugieren wird empfohlen.

**Verdünnungsfaktor (1a. oder 1b.):**

**1:50**

### **HINWEIS**

Für die Bestimmung von TNF- $\alpha$  aus Stuhl weisen wir darauf hin, dass Stuhlproben unbedingt nach der Abnahme (spätestens zwei Stunden 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. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.

- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung von der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Die Immundiagnostik AG übernimmt hierfür keine Haftung.

### *Pipettierschema*

Vor Gebrauch Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (18-26°C) bringen und gut mischen. Direktes Sonnenlicht während der Inkubationsschritte vermeiden. Mikrotiterstreifen während der Inkubationsschritte mit Folie abdecken. Es wird empfohlen die Bestimmungen in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

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

1. **100  $\mu$ l STD** (Standards), **SAMPLE** (Probe/n) und **CTRL** (Kontrollen) 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** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf saugfähigem Papier ausschlagen.
4. **100  $\mu$ l** verdünnten **AB** (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** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf saugfähigem Papier ausschlagen.
7. **100  $\mu$ l** verdünntes **CONJ** (Konjugat) pro Vertiefung pipettieren.
8. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
9. Den Inhalt der Platte verwerfen und **5 x mit je 250  $\mu$ l** verdünntem Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf saugfähigem Papier ausschlagen.
10. **100  $\mu$ l SUB** (Substrat) in jede Vertiefung pipettieren.

11. **10-20 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren bis ausreichend große Farbdifferenzen auftreten.
12. **100  $\mu$ l STOP** (Stopplösung) in jede Vertiefung pipettieren.
13. **Extinktion** sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

## 10. ERGEBNISSE

Zur Auswertung des Tests empfehlen wir:

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 von 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0,01).

Alternativ können folgende mathematische Modelle verwendet werden:

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 empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration von 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0,01).

Vor jeder automatischen Auswertung stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchführen; falls dies nicht durch die verwendete Software erfolgt, die Kontrolle manuell durchführen.

### Stuhlproben

Die ermittelte TNF- $\alpha$  Konzentration der Stuhlprobe wird mit **50** multipliziert (Verdünnungsfaktor) um die Konzentration im Stuhl zu bestimmen.

**Achtung:** Falls die Proben zusätzlich verdünnt wurden, muss die eingesetzte Verdünnung bei der Auswertung beachtet werden.

## 11. EINSCHRÄNKUNGEN

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

Die eingesetzte Verdünnung ist bei der Auswertung zu beachten.

## 12. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen Kontrollen bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegt der Messwert einer Kontrolle außerhalb des angegebenen Gültigkeitsbereichs, kann die Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Werte nicht gewährleisten.

### *Erwartete Ergebnisse*

#### **Referenzwert für TNF- $\alpha$**

**Plasma (augenscheinlich gesunde Personen, n = 40):** < 20 pg/ml

## 13. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Präzision und Reproduzierbarkeit*

#### **Intra-Assay**

Die Präzision von einer Probe wurde innerhalb einer Messserie geprüft. Eine Normalprobe wurde 20 mal in einem TNF- $\alpha$  ELISA von einer Person angesetzt.

n= 20

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

**Inter-Assay**

Die Reproduzierbarkeit von einer Probe wurde geprüft. Eine Normalprobe wurde an verschiedenen Tagen und von verschiedenen Personen im TNF- $\alpha$  ELISA gemessen.

n= 20

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

*Sensitivität*

Die untere Nachweisgrenze des TNF- $\alpha$  ELISA wurde festgesetzt als  $B_0 + 2SD$ . Sie beträgt 10 pg/ml.

*Kreuzreaktivität*

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

*Linearität*

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

**14. LITERATUR**

1. Cerami A, Beutler B (1988). "The history, properties, and biological effects of cachectin". *Biochemistry* 27 (20): 7575–7582.
2. Chen G, Goeddel DV (2002). "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway". *Science* 296 (5573): 1634–5.
3. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology". *Cell* 104 (4): 487–501.

4. Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N (2010). "A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease". *Biol Psychiatry* 68 (10): 930-941.
5. Vilcek J, Lee TH (1991). "Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions". *J. Biol. Chem.* 266 (12): 7313–7316.
6. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003). "Tumor necrosis factor signaling". *Cell Death Differ.* 10 (1): 45–65.

## 15. 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 Humanseren verwendet wurden, sind diese auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befunden worden. Jedoch sollten die Testkomponenten 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.
- 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 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.

**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*

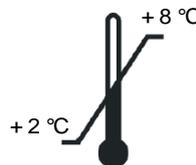
Valid from 23.11.2012



**K 9610**



96



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 intended for the quantitative determination of TNF- $\alpha$  in plasma, serum, stool and cell culture supernatant. For *in vitro* diagnostic use only.

## 2. INTRODUCTION

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

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

Elevated TNF- $\alpha$  serum levels are found in patients suffering from Crohn's disease, ulcerating colitis or rheumatoid arthritis.

## 3. TEST PRINCIPLE

This Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) allows the quantitative determination of TNF- $\alpha$ . In a first incubation step, TNF- $\alpha$  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, a second monoclonal anti-TNF- $\alpha$  antibody and a horseradish peroxidase labeled conjugate are added. 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 coated 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	STDKONZ	Standard concentrate, lyophilized	3 x 1 vial
K 9610KO1	CTRL	Control, lyophilized	3 x 1 vial
K 9610KO2	CTRL	Control, lyophilized	3 x 1 vial
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

- Ultra pure water\*
- 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

\*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  $\mu$ m) with an electrical conductivity < 0.055  $\mu$ S/cm at 25°C ( $\geq$ 18.2 M $\Omega$  cm).

## 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that the 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 three 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 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 stock solution. The crystals must be re-dissolved in a water bath at 37°C before dilution. The **WASHBUF** 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 **AB** + 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 cannot be stored.**
- The **CONJ** (conjugate) 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 cannot be stored.**
- The lyophilized **CTRL** (controls) are stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. The **CTRL** must be reconstituted with **500  $\mu$ l** of **STDBUF** (standard dilution buffer). Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to ensure complete reconstitution. **Reconstituted controls are not stable and cannot be stored.**
- The lyophilized **standard concentrate** (STDKONZ) must be reconstituted in **standard dilution buffer** (STDBUF). To prepare a calibration curve, dilute the reconstituted standard concentrate in **1:2** dilution steps. Reconstitution volume, dilution scheme and the resulting concentrations are described in the product specification data sheet.

The lyophilized standard concentrate (STDKONZ) is stable up to the date stated on the label when stored closed at **2–8°C**. **The reconstituted standard concentrate is not stable and cannot 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, 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 colour 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. SAMPLE PREPARATION

### Stool samples

#### *Extraction of the stool sample*

##### **1a. Stool Sample Application System (SAS)** (Cat. No.: K 6998SAS)

###### ***Stool sample tube – Instruction for use***

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

###### **SAS with 0.75 ml Buffer:**

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

###### **Diluted wash buffer is used as extraction buffer.**

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 remarkably inhomogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.
- b) **Fill the empty sample tube with 0.75 ml** of ready-to-use extraction buffer before using it with the sample. Important: Allow the extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert yellow dipstick into sample. The lower part of the dipstick exhibits 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 and leave 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. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with buffer for app. 10 minutes improves the result.
- e) Allow sample to stand for app. 10 minutes until sediment has settled down. Floating material like shells of grains can be neglected.
- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the turquoise ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure, the sediment will not be dispersed again.

**1b. Sample preparation kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany (Cat. No. 10 745 804 322)**

Alternatively, other stool sample preparation kits (e.g. Sample preparation kit from Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) can be used. In the Roche sample preparation kit, 100 mg of stool sample are suspended in 5 ml of extraction buffer using a vibrator mixer (e.g. Vortex mixer). Centrifugation of the suspension is recommended.

**Dilution Factor (1a. or 1b.):** **1:50**

**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**

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

**9. ASSAY PROCEDURE***Procedural notes*

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore, we recommend not to assemble wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- 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. The Immundiagnostik AG 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 sunlight during all incubation steps. Cover the microtiter plate during the different incubation steps. Carry out the tests in duplicate.

Wash the coated 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 liquid.

1. Add **100  $\mu$ l** of **STD** (Standards), **SAMPLE** (Sample/s) or **CTRL** (Controls) into respective well.
2. Incubate for **2 hours** at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer.
3. Decant the contents of the plate and wash the cavities **5 x with 250  $\mu$ l** washing buffer solution. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess liquid.
4. Add **100  $\mu$ l** of diluted **AB** (2. antibody).
5. Incubate for **1 hour** at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer.
6. Decant the contents of the plate and wash the cavities **5 x with 250  $\mu$ l** washing buffer solution. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess liquid.
7. Add **100  $\mu$ l** of diluted **CONJ** (conjugate).
8. Incubate for **1 hour** at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer.
9. Decant the contents of the plate and wash the cavities **5 x with 250  $\mu$ l** washing buffer solution. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess liquid.
10. Add **100  $\mu$ l** of **SUB** (TMB substrate).
11. Incubate for **10-20 minutes** at room temperature (18-26°C).
12. Add **100  $\mu$ l STOP** (stop solution) and mix shortly.

13. Determine the **absorption** 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.

## 10. RESULTS

We recommend to use the 4-parameter-algorithm to calculate the results.

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 calibrator has to be specified with a value smaller than 1 (e. g. 0.01).

Alternatively, following algorithms can be used:

2. Point-to-point-calculation

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

3. Spline-algorithm

We recommend for the optical density a linear ordinate and for the concentration a logarithmic abscissa. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator has to be specified with a value smaller than 1 (e. g. 0.01).

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a manual control of the paired values should be made.

### Stool

To obtain the TNF- $\alpha$  concentration of a sample, multiply the estimated value by the dilution factor of **50**.

**Note:** If the sample is further diluted, this dilution must be considered by the calculation of the TNF- $\alpha$  concentration.

## 11. LIMITATIONS

Samples with TNF- $\alpha$  levels greater than the highest calibrator, should be diluted and re-assayed. This dilution must be considered by the calculation of the TNF- $\alpha$  concentration.

## 12. QUALITY CONTROL

Control samples should be analyzed 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.

### *Expected values*

#### **Reference value for TNF- $\alpha$**

**Plasma (apparently healthy persons, n = 40):** < 20 pg/ml

## 13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Precision and reproducibility*

#### **Intra-Assay**

The precision of the TNF- $\alpha$  ELISA test was calculated from 20 replicate determinations of one sample.

n= 20

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

#### **Inter-Assay**

The reproducibility of the TNF- $\alpha$  ELISA test was calculated from data obtained by several persons measuring a normal range sample on different days.

n= 20

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

### Sensitivity

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

### Cross reactivity

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

### 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. REFERENCES

1. Cerami A, Beutler B (1988). "The history, properties, and biological effects of cachectin". *Biochemistry* 27 (20): 7575–7582.
2. Chen G, Goeddel DV (2002). "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway". *Science* 296 (5573): 1634–5.
3. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology". *Cell* 104 (4): 487–501.
4. Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N (2010). "A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease". *Biol Psychiatry* 68 (10): 930-941.
5. Vilcek J, Lee TH (1991). "Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions". *J. Biol. Chem.* 266 (12): 7313–7316.

6. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003). "Tumor necrosis factor signaling". *Cell Death Differ.* 10 (1): 45–65.

## 15. 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, 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.
- 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 &lt;n&gt; tests



Manufacturer



Use by



Lot number