

# IDK<sup>®</sup> TNF $\alpha$ ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung von 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 2022-03-07

**REF** K 9610



**IVD** **CE**



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)



# Inhalt

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>3. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>2</b>
<b>4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>3</b>
<b>5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>4</b>
<b>6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG</b>	<b>5</b>
<i>Probenlagerung</i>	5
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	5
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>6</b>
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	7
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>8</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>9</b>
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>9</b>
<i>Referenzwerte</i>	10
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>10</b>
<i>Linearität</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	11
<i>Spezifität</i>	11
<b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>11</b>
<b>13. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>12</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>13</b>
<b>15. LITERATUR</b>	<b>13</b>

## 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 Tumorstromwachstum 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 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K 9610	AB	Antikörperkonzentrat (Maus anti-hTNF-α, biotinyliert)	1 x 150 µl
K 9610	CONJ	Konjugatkonzentrat, peroxidase markiert	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 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	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\*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000  $\mu$ l
- 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  $> 0,2 \mu$ m) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von  $0,055 \mu$ S/cm bei 25 °C ( $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ).

## 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 3x 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 bei **2–8°C** gelagerte **WASHBUF** kann bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet 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** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. **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** gelagert, bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden**.
- **Die lyophilisierten Kontrollen (CTRL)** sind, bei **2–8°C** gelagert, 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** gelagert, 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 Haltbarkeitsdatum (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  $\mu$ l** der **Verdünnung** werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Testprinzip*

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von humanem TNF- $\alpha$ .

In diesem Assay wird TNF- $\alpha$  an auf die Mikrotiterplatte fixierte monoklonale Antikörper gebunden. Nach einem Waschschrift erfolgt die Zugabe eines biotinylierten Antikörpers, nach einem weiteren Waschschrift die Zugabe 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. 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 müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische 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 <b>vor Gebrauch 5 x mit je 250 <math>\mu</math>l Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	<b>100 <math>\mu</math>l Standards/Kontrollen/Proben</b> in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und <b>2 Stunden</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>unter Schütteln*</b> inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 <math>\mu</math>l Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	<b>100 <math>\mu</math>l Antikörper</b> (verdünntes AB) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>unter Schütteln*</b> inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 <math>\mu</math>l Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	<b>100 <math>\mu</math>l Konjugat</b> (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	Streifen abdecken und <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>unter Schütteln*</b> inkubieren.

10.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 <math>\mu</math>l Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
11.	<b>100 <math>\mu</math>l Substrat (SUB)</b> in jede Vertiefung pipettieren.
12.	<b>10–20 min**</b> bei Raumtemperatur (15–30 °C) <b>im Dunkeln</b> inkubieren.
13.	<b>100 <math>\mu</math>l Stopplösung (STOP)</b> in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen
14.	<b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> 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 <b>405 nm</b> 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) können 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*

Analytische Sensitivität siehe Kapitel „Testcharakteristika“.

## 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

### Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde mittels einer seriellen Verdünnung von 2 Serum-Proben nachgewiesen.

Für TNF $\alpha$  wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 11,56 bis 410,94 pg/ml nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als  $\pm 20\%$ .

Probe	Verdünnung	Erwartet [pg/ml]	Gemessen [pg/ml]	Wiederfindung [%]
A	1:3	410,94	410,94	100,00
	1:6	205,47	163,03	79,35
	1:12	102,73	87,43	85,11
	1:24	51,37	60,58	117,93
	1:48	25,68	30,49	118,70
B	1:6	92,48	92,48	100,00
	1:12	46,24	43,86	94,86
	1:24	23,12	22,30	96,46
	1:48	11,56	13,76	119,07

### Analytische Sensitivität

Der im Folgenden aufgeführte Wert wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt. Hierzu wurde der Leerwert 24-mal gemessen.

Leerwert (*limit of blank*, LoB)

4,937 pg/ml

## Genauigkeit – Präzision

### Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 9

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Kontroll-Proben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, Messgerät, Tag, Kitcharge identisch) bestimmt.

Probe	Mittelwert [pg/ml]	VK [%]
1	26,04	3,0
2	90,38	5,9

### Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 54

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 2 Kontroll-Proben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, Messgeräte, Tage, Kitchargen unterschiedlich) bestimmt.

Probe	Mittelwert [pg/ml]	VK [%]
1	24,43	14,8
2	101,03	9,5

## Spezifität

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

## 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 gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit

den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.

- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.

**Achtung:** Verursacht schwere Augenreizung. **BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- 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. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

### 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 dem 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 super-families: 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



Spezifikationsdatenblatt beachten



Bestellnummer



Zu verwenden mit



Inhalt ausreichend für <n>  
Prüfungen



Verwendbar bis



Gebrauchsanweisung beachten



Reizend

# IDK<sup>®</sup> TNF $\alpha$ ELISA

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

Valid from 2022-03-07

**REF** K 9610



**IVD** **CE**



**Immundiagnostik AG**, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>17</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>17</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>18</b>
<b>5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>18</b>
<b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>	<b>19</b>
<i>Sample storage</i>	19
<i>Extraction of the stool samples</i>	20
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>21</b>
<i>Principle of the test</i>	21
<i>Test procedure</i>	21
<b>8. RESULTS</b>	<b>22</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>23</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>24</b>
<i>Reference range</i>	24
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>24</b>
<i>Accuracy – Precision</i>	24
<i>Analytical sensitivity</i>	25
<i>Linearity</i>	25
<i>Specificity</i>	25
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>26</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>26</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>27</b>
<b>15. REFERENCES</b>	<b>27</b>

## 1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay 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 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 cytotoxicity 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. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 9610	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K 9610	AB	Antibody concentrate (mouse anti-human-TNF- $\alpha$ , biotinylated)	1 x 150 $\mu$ l
K 9610	CONJ	Conjugate concentrate, peroxidase-labelled	1 x 200 $\mu$ l
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 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 0003.15	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

- Ultrapure water\*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000  $\mu$ l single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

\* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure 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 of 0.055  $\mu$ S/cm at 25 °C ( $\geq$  18.2 M $\Omega$ 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  $\mu$ l** 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 ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** can

be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8 °C**. **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  $\mu$ l AB+ 10ml wash buffer). The AB can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8 °C**. **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  $\mu$ l CONJ + 10ml wash buffer). The CONJ can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8 °C**. **Conjugate** (1:101 diluted CONJ) **is not stable and cannot be stored**.
- The **lyophilised controls (CTRL)** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8 °C**. **Reconstitution** details are given in the **specification data sheet**. **Controls** (reconstituted CTRL) **are not stable and cannot be stored**.
- The **lyophilised standard concentrate (STDKONZ)** can be used until the expiry date stated on the label when stored at **2–8 °C**. **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 can be used until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

## 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

### *Sample storage*

#### **Stool samples**

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.

#### **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:

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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  $\mu$ l** 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 together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2–8 °C. Strips are stable until the 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.	<b>Before use</b> , wash the wells <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each <b>100 µl standards/controls/samples</b> into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for <b>2 hours</b> at room temperature (15–30 °C) on a <b>horizontal shaker*</b> .
4.	Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add <b>100 µl antibody</b> (diluted AB) into each well.

6.	Cover the strips and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30 °C) on a <b>horizontal shaker*</b> .
7.	Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 <math>\mu</math>l wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add <b>100 <math>\mu</math>l conjugate</b> (diluted CONJ) into each well.
9.	Cover the strips and incubate for <b>1 hour</b> at room temperature (15–30 °C) on a <b>horizontal shaker*</b> .
10.	Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 <math>\mu</math>l wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
11.	Add <b>100 <math>\mu</math>l substrate</b> (SUB) into each well.
12.	Incubate for <b>10–20 min**</b> at room temperature (15–30 °C) in the <b>dark</b> .
13.	Add <b>100 <math>\mu</math>l stop solution</b> (STOP) into each well and mix well.
14.	Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> 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 <b>405 nm</b> 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) can be further diluted and re-assayed. Please consider this higher 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*

Analytical sensitivity see chapter "Performance Characteristics".

## 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

### *Accuracy – Precision*

#### **Repeatability (Intra-Assay); n = 9**

The repeatability was assessed with 2 control samples under **constant** parameters (same operator, instrument, day and kit lot).

Sample	Mean value [pg/ml]	CV [%]
1	26.04	3.0
2	90.38	5.9

#### **Reproducibility (Inter-Assay); n = 54**

The reproducibility was assessed with 2 control samples under **varying** parameters (different operators, instruments, days and kit lots).

Sample	Mean value [pg/ml]	CV [%]
1	24.43	14.8
2	101.03	9.5

### Analytical sensitivity

The following value has been estimated based on the concentrations of the standards without considering possibly used sample dilution factors. For this, the blank value was measured 24 times:

Limit of blank, LoB 4.937 pg/ml

### Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed by serial dilution of 2 different serum samples.

For TNF $\alpha$  the method has been demonstrated to be linear from 11.56 to 410.94 pg/ml showing a non-linear behaviour of less than  $\pm 20\%$  in this interval.

Sample	Dilution	Expected [pg/ml]	Obtained [pg/ml]	Recovery [%]
A	1:3	410.94	410.94	100.00
	1:6	205.47	163.03	79.35
	1:12	102.73	87.43	85.11
	1:24	51.37	60.58	117.93
	1:48	25.68	30.49	118.70
B	1:6	92.48	92.48	100.00
	1:12	46.24	43.86	94.86
	1:24	23.12	22.30	96.46
	1:48	11.56	13.76	119.07

### 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 or ProClin are hazardous to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions may also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances must be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.

**Warning:** Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: get medical Advice/attention.

- 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 sent 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 super-families: 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
	Consult specification data sheet		Irritant



## **Immundiagnostik AG**

Stubenwald-Allee 8a  
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

[info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

