



TNF- α *ex vivo*

Lateral Flow Immunoassay for the quantitative measurement of human TNF- α in cell culture supernatants after LPS stimulation, interpretation by Milenia® POCScan Reader
English: Page 1-8

Lateralfuss-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von humanem TNF- α in Zellkulturüberständen nach LPS-Stimulation, Auswertung mit Milenia® POCScan Reader
Deutsch: Seite 9-16

Immunoassay för lateralfödестeknik avsedd för kvantitativ bestämning av humant TNF- α i cellkultur supernatanter efter LPS stimulering, avläsning med Milenia® POCScan Reader
Svenska: Sidorna 17-24

REF:

MQEVS 1



IVD








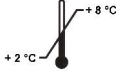



Milenia Biotec GmbH
Versailler Str. 1
D-35394 Gießen
Germany



Tel.: +49-641-94 8883-0
Fax: +49-641-94 8883-80
E-mail: info@milenia-biotec.de
<http://www.milenia-biotec.de>

Explanation of Symbols

Symbols (GB) Symbole (DE) Symboles (FR) Simboli (IT) Símbolos (ES) Jelölés (HU) Symbole (PL) Σύμβολα (GR) Symbolen (NL) Symboler (S)	Explanation Erklärung Significato Significado Signification Magyarázat Objaśnienia Επαξήγηση Verklaring Förklaring	Symbols (GB) Symbole (DE) Simboli (IT) Símbolos (ES) Symboles (FR) Jelölés (HU) Symbole (PL) Σύμβολα (GR) Symbolen (NL) Symboler (S)	Explanation Erklärung Significato Significado Signification Magyarázat Objaśnienia Επαξήγηση Verklaring Förklaring
	Expiry date Haltbarkeitsdatum Data di scadenza Fecha de caducidad Date d'expiration Lejárati idő Data przydatności Ημερομηνία Λήξης Uiterste gebruiksdatum		Package size Packungsgröße Numero di test Número de determinaciones Nombre de tests par trousse Kiszerezés nagysága Ilość testów Μέγεθος Συσκευασίας Verpakkingsgrootte
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device In Vitro Diagnostikum Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Para uso en el Diagnóstico <i>in vitro</i> Diagnostic <i>in vitro</i> In vitro diagnosztikum Do diagnostyki <i>In Vitro</i> In Vitro ιατρική διαγνωστική συσκευή Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek		Manufacturer Hersteller Produttore Fabricante Fabriqué par Gyártó Producent Παραγωγός Fabrikant
	Batch code Los-Bezeichnung Codice del lotto Lote Numéro de lot Sarzszám Kod partii towaru Αριθμός Παρτίδας Partijnummer		Only for evaluation purposes Nur zur Leistungsbewertung Solo per uso sperimentale Con fines exclusivos de evaluación Pour évaluation uniquement Kizárólag vizsgálati célokra Tylko do oceny produktu Μόνο για λόγους αξιολόγησης Uitsluitend ter evaluatie
REF	Catalogue number Artikel-Nummer Numero di catalogo Referencia Référence Katalógusszám Numer katalogowy Αριθμός Καταλόγου Catalogusnummer		Consult Instructions for Use Gebrauchsanweisung beachten Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instrucciones de uso Consulter la notice A használati utasítás tanulmányozandó Informacja dla użytkownika Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Storage conditions Lagerungsbedingungen Temperatura di conservazione Temperatura de conservación Température de conservation Tárolási körülmények Temperatura przechowywania Συνθήκες Φύλαξης Bewaarcondities		Consult attended documents Begleitdokumente beachten Consultare i documenti relativi Consultar documentos adjuntos Consulter le document avec attention A csatolt dokumentumok tanulmányozandók Dodatkowe dokumenty Συμβουλευτείτε τα αντίστοιχα έντυπα Raadpleeg bijgevoegde documenten

Materials Supplied, Storage and Stability

Components	Cat.-No.	Content	Preparation	Storage at	Shelf life
Test Unit: membrane coated with polyclonal (rabbit) anti-hTNF- α antibody; monoclonal (mouse) anti-hTNF- α antibody in gold conjugate	MQSEV	30 pieces	ready to use	2 - 8 °C Use immediately after opening the plastic bag!	in the closed plastic bag until the expiration date
Stimulation Reagent: Lipopolysaccharide (LPS)	MREVS	1 vial, 10 ng	lyophilized; at least 30 minutes before use, reconstitute the lyophilized LPS with 1 mL pyrogen-free distilled water. Mix thoroughly by gentle inversion before use. The reconstituted solution should be further diluted 1-in-20 with cell culture medium to a final concentration of 500 pg/mL (e.g., 1 mL reconstituted LPS solution and 19 mL Cell Culture Medium). Pipet 500 μ L of this solution into 1.5 mL reaction cups.	2-8 °C (lyophilized and reconstituted)	lyophilized until the expiration date; after reconstitution and dilution for four weeks at 2-8°C
Certificate of Analysis	CoA-QEVS	1			

Material Safety Data Sheets are available on request (look as well www.milenia-biotec.de).

Materials Required

- Distilled, pyrogen free water
- Cell Culture Medium RPMI with Glutamine;
recommendation: Company Biochrom, Berlin/Germany, www.biochrom.de (Order code FG 1215)
- Pipets for 50, 100, 500 and 1000 μ L
- Closable (sterile not necessary) reaction cups for 1.5 mL; closable (sterile) plastic tubes for dilution
- Incubator for $37 \pm 1^\circ\text{C}$
- Centrifuge for 1,000 g

Specimen Collection and Preparation

For the whole blood stimulation heparinized blood should be taken according the rules of medical profession. It must be guaranteed that the blood collection system is pyrogen-free and no clotting takes place. The procedure calls for 50 μ L of blood per assay. The blood can be stored in the collection tubes at room temperature for 8 hours. Within this time the incubation of the sample should be started.

For determination of TNF- α in these stimulated culture supernatants, the sample should be immediately determined after stimulation. The procedure calls for 100 μ L sample volume per test.

Warnings and Precautions

All reagents of this test kit are strictly intended for *in vitro* diagnostic use only. Use by staff, who is specially informed and trained in methods which are carried out by use of *in vitro* diagnostics. Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol.

Sample material of patients (for example serum or plasma) normally used in laboratory determinations are always classified as potentially infectious. Samples of risk patients should be specially labelled and if necessary be handled in safety work benches (for example lamina flow bench).

Method and Test Principle

Milenia[®] QuickLine TNF- α *ex vivo* is the combination of standardized lipopolysaccharide (LPS) for the stimulation of human whole blood samples together with a lateral flow immunoassay for the quantitative measurement of human Tumor-Necrosis-Factor- α (TNF- α) in these cell culture supernatants.

Heparinized whole blood samples are incubated at 37°C with a standardized stimulation solution containing LPS in cell culture medium. By that the immune cells of the blood (especially the monocytes/macrophages) are stimulated to produce cytokines. By centrifugation a supernatant is collected, in which cytokines can be measured. In comparison to control experiments, the TNF- α amount produced can be indicative of activation or suppression of patient's immune system.

The culture supernatant sample is pipetted in the sample application of the test unit. TNF- α of the patient sample binds to a monoclonal anti-TNF- α antibody conjugated to gold particles. The TNF- α loaded gold particles diffuse through the membrane and overflow the test band (T). There, a polyclonal antibody specific for TNF- α is coated on the membrane; so gold particles were specifically bound and become visible as a red-blue band. Colour intensity is directly proportional to the concentration of TNF- α in the sample and band intensity increases during incubation time. The surplus of gold particles continues to diffuse over the test device. The conjugate specific antibodies printed as a line on the membrane (control band, C) capture the rest of gold conjugate and a well visible line develops during the incubation time.

Interpretation of results is only possible with Milenia[®] POCScan Reader, which allows an objective interpretation and documentation of the result.

The TNF- α concentration directly correlates with the colour intensity of the test band (T). The Milenia[®] POCScan Reader measures the colour reflection of the test band. The result is calculated according a programmed standard curve.

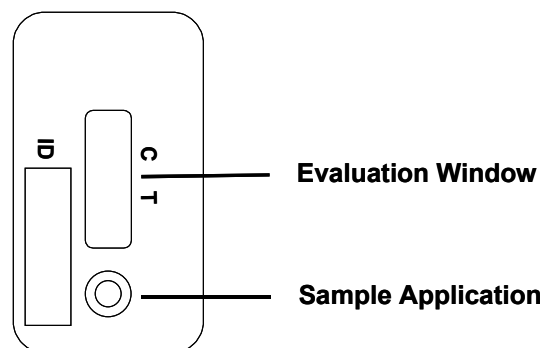
Assay Procedure

Attention:

- Do not interchange components of different lots.
- All components should be at room temperature (18 – 28 °C) before use.
- All components of these test kits, supplied as concentrate should be diluted to their final concentration at least 30 minutes prior to use. Mix well, but prevent foam formation.
- **A normal donor must be assayed for control!**

Further control experiments are recommended according to the respective objective.



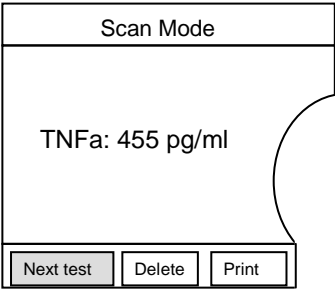
1. Pipette **500 µL** of the ready prepared stimulation solution (LPS, 500 pg/mL) into 1.5 mL reaction cups.
2. Add **50 µL** (gently mixed) whole blood.
3. Mix preparation very carefully and incubate at 37 ± 1 °C for **4 hours**.
4. After incubation mix carefully and centrifuge **5 minutes** at 1,000 x g.
5. Pipette **100 µL** of the clear supernatant into the sample application of the test unit.
6. Incubate test unit **20 minutes** at room temperature.
7. Interpret result **immediately afterwards** with the Milenia® POCScan Reader (see page 6).



Test Performance with Milenia® POCScan Reader

Important notes:

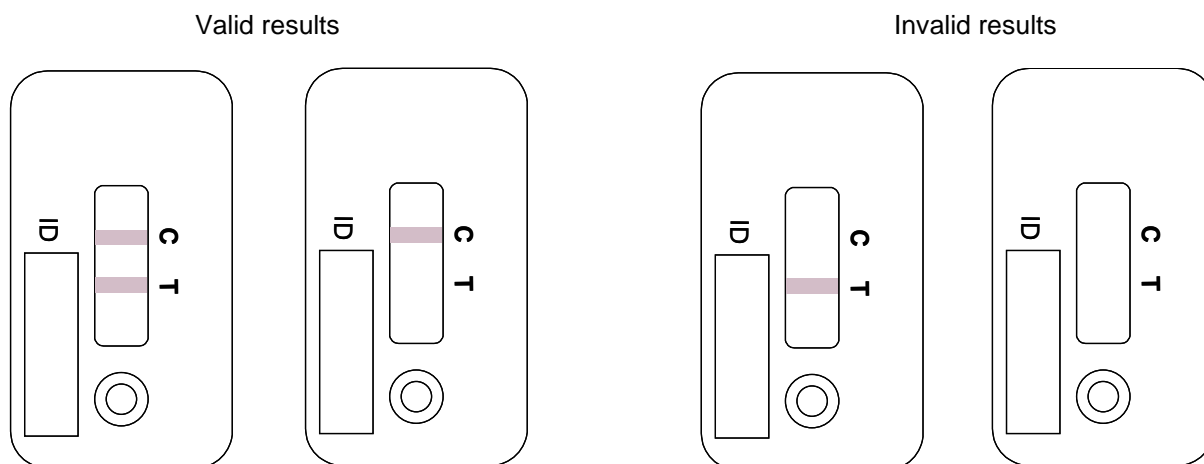
- Prior performing the test read this instruction and the Milenia® POCScan Reader manual carefully! Follow the procedure step by step and notice the sequence!
- Before measurement, check the current lot of the used kit (see kit outerbox label!). If necessary import the data by RFID reader from the kit outerbox-label or fill them in manually according the certificate of analysis of the used kit (see Manual Milenia® POCScan Reader, Enter Calibration coefficients).

	Step	
1.		<p>Insert test unit in the Milenia® POCScan Reader.</p> <p>Pay attention to the position of test unit in the drawer!</p>
2.		<p>Close the drawer of the Milenia® POCScan Reader!</p> <p>Start measurement <u>immediately</u>.</p>
3.		<p>After scanning the result will show up in the display.</p> <p>The result must not be interpreted later!</p> <p>Only valid results are displayed.</p> <p>If result is not valid, the test must be repeated.</p> <p>For details see chapter “trouble shooting” in the manual of the Milenia® POCScan Reader.</p> <p>The manual can be downloaded from the website www.milenia-biotec.de</p>

Internal Quality Control

In any case, the control band (C) has to appear!

It is used only as functional control and can not be used for the interpretation of the test band. If the control line is not detectable after 20 minutes incubation time, the result is invalid! The analysis has to be repeated with a new test unit!



Interpretation of Results

During measurement the software controls, whether the results are valid. If the test is not valid, no test result will be shown (look "Internal Quality Control").

The normal donor used in the stimulation assay as a control of the experiment should fit the below listed TNF- α range.

It is recommended, that each laboratory checks the listed normal range, respectively establishes its own range. This TNF- α reference range should be regarded as guidelines only.

In General: Results should always be verified concerning the entire clinical status of the patient. Additionally every decision for therapy should be taken individually.

Expected values

In a preliminary reference study heparinized whole blood of normal donors (n = 21) was performed with the Milenia[®] QuickLine TNF- α ex vivo.

The following TNF- α values were established in the cell culture supernatants:

Range:	302 upto 1,886 pg/mL
Mean:	926 pg/mL
5% Percentile:	475 pg/mL
95 Percentile:	1,789 pg/mL

Assay Characteristics

Sample material:	Cell culture supernatant
Incubation time:	20 minutes at room temperature (18 - 28 °C)
Measurement range:	200 – 10,000 pg/mL
Lower detection limit:	200 pg/mL
Specificity:	Highly specific for the human TNF- α
Calibration:	Calibrated against 2 nd International Standard TNF- α NIBSC 88/786
High-Dose-Hook-Effect:	Not detectable for samples below 1 μ g/mL TNF- α



TNF- α *ex vivo*

Lateral Flow Immunoassay for the quantitative measurement of human TNF- α in culture supernatants after LPS stimulation, interpretation by Milenia® POCScan Reader
English: Page 1-8

Lateralfluss-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von humanem TNF- α in Kulturüberständen nach LPS-Stimulation, Auswertung mit Milenia® POCScan Reader
Deutsch: Seite 9-16

Immunoassay för lateralfördeteknik avsedd för kvantitativ bestämning av humant TNF- α i cellkultur supernatanter efter LPS stimulering, avläsning med Milenia® POCScan Reader
Svenska: Sidorna 17-24

REF:

MQEVS 1



IVD








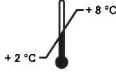



Milena Biotec GmbH
Versailler Str. 1
D-35394 Gießen
Germany



Tel.: +49-641-94 8883-0
Fax: +49-641-94 8883-80
E-mail: info@milena-biotec.de
<http://www.milena-biotec.de>

Erklärung der Symbole

Symbols (GB) Symbole (DE) Symboles (FR) Simboli (IT) Símbolos (ES) Jelölés (HU) Symbole (PL) Σύμβολα (GR) Symbolen (NL) Symboler (S)	Explanation Erklärung Significato Significado Signification Magyarázat Objaśnienia Επαξήγηση Verklaring Förklaring	Symbols (GB) Symbole (DE) Simboli (IT) Símbolos (ES) Symboles (FR) Jelölés (HU) Symbole (PL) Σύμβολα (GR) Symbolen (NL) Symboler (S)	Explanation Erklärung Significato Significado Signification Magyarázat Objaśnienia Επαξήγηση Verklaring Förklaring
	Expiry date Haltbarkeitsdatum Data di scadenza Fecha de caducidad Date d'expiration Lejárati idő Data przydatności Ημερομηνία Λήξης Uiterste gebruiksdatum		Package size Packungsgröße Numero di test Número de determinaciones Nombre de tests par trousse Kiszerezés nagysága Ilość testów Μέγεθος Συσκευασίας Verpakkingsgrootte
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device In Vitro Diagnostikum Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Para uso en el Diagnóstico <i>in vitro</i> Diagnostic <i>in vitro</i> In vitro diagnosztikum Do diagnostyki <i>In Vitro</i> In Vitro ιατρική διαγνωστική συσκευή Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek		Manufacturer Hersteller Produttore Fabricante Fabriqué par Gyártó Producent Παραγωγός Fabrikant
	Batch code Los-Bezeichnung Codice del lotto Lote Numéro de lot Sarzszám Kod partii towaru Αριθμός Παρτίδας Partijnummer		Only for evaluation purposes Nur zur Leistungsbewertung Solo per uso sperimentale Con fines exclusivos de evaluación Pour évaluation uniquement Kizárólag vizsgálati célokra Tylko do oceny produktu Μόνο για λόγους αξιολόγησης Uitsluitend ter evaluatie
REF	Catalogue number Artikel-Nummer Numero di catalogo Referencia Référence Katalógusszám Numer katalogowy Αριθμός Καταλόγου Catalogusnummer		Consult Instructions for Use Gebrauchsanweisung beachten Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instrucciones de uso Consulter la notice A használati utasítás tanulmányozandó Informacja dla użytkownika Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Storage conditions Lagerungsbedingungen Temperatura di conservazione Temperatura de conservación Température de conservation Tárolási körülmények Temperatura przechowywania Συνθήκες Φύλαξης Bewaarcondities		Consult attended documents Begleitdokumente beachten Consultare i documenti relativi Consultar documentos adjuntos Consulter le document avec attention A csatolt dokumentumok tanulmányozandók Dodatkowe dokumenty Συμβουλευτείτε τα αντίστοιχα έντυπα Raadpleeg bijgevoegde documenten

Kitbestandteile, Lagerung und Stabilität

Komponente	Art.-Nr.	Inhalt	Vorbereitung	Lagerung bei	Haltbarkeit
Test-Einheit (Test Unit): Membran beschichtet mit polyklonalen (Kaninchen) anti-hTNF- α Antikörpern; monoklonaler (Maus) anti-hTNF- α Antikörper im Goldkonjugat	MQSEV	30 Stück	gebrauchsfertig	2 - 8 °C Sofort nach dem Öffnen des Plastikbeutels verwenden!	im verschlossenen Folienbeutel bis zum Verfallsdatum
Stimulationsreagenz (Stimulation Reagent): Lipopolysaccharid (LPS)	MREVS	1 Fl., 10 ng	lyophilisiert; mindestens 30 Minuten vor Gebrauch das lyophilisierte LPS mit 1 ml pyrogenfreiem, destilliertem Wasser auflösen. Sorgfältig mischen. Die rekonstituierte Lösung mittels einer 1:20 Verdünnung auf eine Endkonzentration von 500 pg/ml bringen (z. B. 1 ml rekonstituierte LPS-Lösung mit 19 ml Zellkulturmedium verdünnen). 500 μ l dieser Stimulationslösung auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilen.	2 - 8 °C (lyophilisiert und aufgelöst)	lyophilisiert bis zum Verfallsdatum; nach dem Auflösen und Verdünnen bis zu vier Wochen bei 2-8°C
Analysen-Zertifikat (Certificate of Analysis)	CoA-QEVS	1			

Sicherheitsdatenblätter sind auf Anfrage erhältlich (siehe auch unter www.milenia-biotec.de).

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

- Destilliertes, pyrogen-freies Wasser
- Zellkulturmedium RPMI mit Glutamin;
Empfehlung: Firma BioChrom, Berlin, www.biochrom.de (Bestell-Nr. FG 1215)
- Mikropipetten für 50, 100, 500 und 1000 μ l
- Verschließbare Reaktionsgefäße für 1,5 ml; verschließbare (sterile) Plastikröhrchen für die Verdünnung
- Inkubator für 37 ± 1 °C
- Zentrifuge mit 1000 g

Probenentnahme und -vorbereitung

Für die Vollblutstimulation wird heparinisiertes Blut nach den üblichen ärztlichen Regeln abgenommen. Es muss sichergestellt sein, dass die Blutabnahmesysteme pyrogenfrei sind und keine Gerinnung stattfindet. Pro Testansatz werden 50 μ l Blut von dem Spender benötigt. Das Blut kann bis zu 8 Stunden im Abnehmeröhrchen bei Raumtemperatur gelagert werden. Innerhalb dieser Zeit sollte die Inkubation der Proben gestartet werden.

Zur Bestimmung von TNF- α in diesen stimulierten Zellkulturüberständen sollte die Probe unmittelbar nach der Stimulation untersucht werden. Es werden 100 μ l Probenvolumen pro Test benötigt.

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Alle Reagenzien dieser Testpackung dürfen ausschließlich zur *in vitro*-Diagnostik verwendet werden. Die Anwendung sollte durch Personal erfolgen, das speziell in Verfahren von *in vitro*-Diagnostika unterrichtet und ausgebildet wurde. Die Einhaltung des vorgeschriebenen Protokolls zur Durchführung des Tests ist unbedingt erforderlich.

Untersuchungsmaterial von Patienten (z.B. Plasma- oder Serumproben), wie es für Laboratoriumsuntersuchungen eingesetzt wird, ist stets als potentiell infektiös einzustufen. Proben von Risikopatienten sollten stets besonders gekennzeichnet werden und ggf. in Sicherheitswerkbänken (z. B. Laminar Flow-Arbeitsplatz) bearbeitet werden.

Methodik und Testprinzip

Der Milenia[®] QuickLine TNF- α *ex vivo* ist eine Kombination aus standardisiertem Lipopolysaccharid (LPS) zur Stimulation von humanem Vollblut und einem Lateralfuss-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von humanem Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) in diesen Zellkulturüberständen.

Heparinisiertes Vollblut von Patienten wird bei 37°C mit einer Stimulationslösung, die in standardisierter Form LPS in Zellkulturmedium enthält, inkubiert. Die im Blut befindlichen Immunzellen (vor allem die Monozyten/Makrophagen) werden dadurch angeregt, Zytokine zu produzieren. Durch Zentrifugation wird ein Überstand gewonnen, in dem die Zytokine gemessen werden können. Im Vergleich zu Kontrollexperimenten gibt die Menge an produziertem TNF- α Auskunft über eine Aktivierung oder Supprimierung des Immunsystems des Patienten.

Der Zellkulturüberstand wird in den Probenauftrag der Testeinheit pipettiert. Das TNF- α der Patientenprobe bindet an einen monoklonalen TNF- α spezifischen Antikörper, der an Goldpartikel gekoppelt ist. Die mit TNF- α beladenen Goldpartikel diffundieren in der analytischen Membran über die Testlinie (T). Dort liegt ein polyklonaler TNF- α spezifischer Antikörper gebunden an die Membran vor; dadurch werden die Goldpartikel spezifisch gebunden und es wird eine rot-blaue Linie sichtbar. Die Farbintensität ist direkt zur TNF- α -Konzentration der Probe proportional und nimmt während der Inkubationszeit zu. Die im Überschuss vorhandenen Goldpartikel diffundieren weiter über den Teststreifen. Die Konjugat-spezifischen Antikörper, die als Linie auf die Membran aufgebracht sind (Kontroll-Linie, C), fangen das restliche Goldkonjugat ab und bilden innerhalb der Inkubationszeit eine gut sichtbare Linie.

Die Auswertung der Ergebnisse ist nur mit dem Milenia[®] POCScan Reader möglich, dieser erlaubt eine objektive Interpretation und Dokumentation der Ergebnisse.

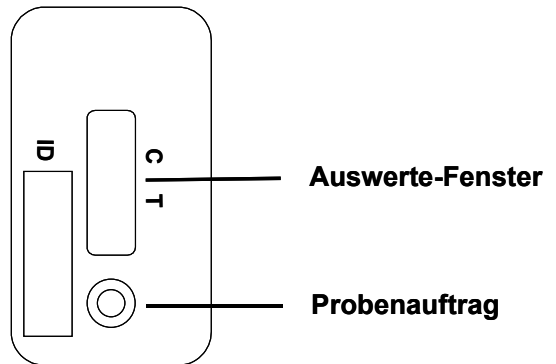
Die Konzentration an TNF- α korreliert direkt mit der Farbintensität der Testlinie (T). Der Milenia[®] POCScan Reader misst die Farbreflexion der Testlinie. Das Ergebnis wird anhand einer gespeicherten Standardkurve berechnet.

Testdurchführung

Achtung:

- Die Komponenten aus Testbestecken verschiedener Chargen nicht austauschen.
- Alle Komponenten auf Raumtemperatur (18 – 28 °C) bringen.
- Die als Konzentrat gelieferten Reagenzien müssen mindestens 30 Minuten vor Gebrauch auf ihre Endkonzentration verdünnt werden. Gut mischen, aber Schaumbildung vermeiden.
- **Als Kontrolle muss ein Normalspender mitgeführt werden!**
Weitere Kontrollexperimente sind in Abhängigkeit von der Fragestellung zu empfehlen.

1. **500 µl** der vorbereiteten Stimulationslösung (LPS, 500 pg/ml) in die 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettieren.
2. **50 µl** heparinisieretes (vorsichtig gemischtes) Vollblut zugeben.
3. Ansatz sehr vorsichtig mischen und **4 Stunden** bei 37 ± 1 °C inkubieren.
4. Nach der Inkubation den Ansatz vorsichtig mischen und **5 Minuten** bei 1000 g abzentrifugieren.
5. **100 µl** von dem klaren Überstand in den Probenauftrag der Testeinheit pipettieren.
6. Die Testeinheit **20 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Das Ergebnis **unmittelbar danach** mit dem Milenia® POCScan Reader auswerten (siehe Seite 14).



Testdurchführung mit Milenia® POCScan Reader

Wichtige Hinweise

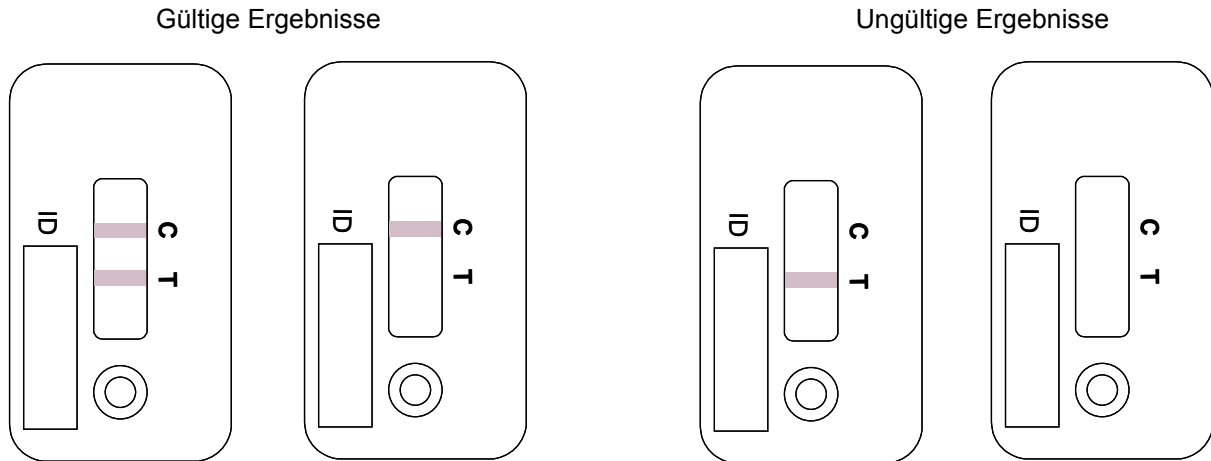
- Vor der Testdurchführung diese Gebrauchsanweisung sowie das Milenia® POCScan Reader Handbuch sorgfältig lesen. Den Test Schritt für Schritt abarbeiten und die Reihenfolge beachten!
- Vor der Messung die aktuelle Lot des verwendeten Kits (siehe Außenetikett der Kitschachtel!) überprüfen. Wenn nötig die Daten mit dem RFID-Lesegerät vom Kit-Außenetikett einlesen oder manuell anhand des Analyse-Zertifikats des verwendeten Kits eingeben (siehe Handbuch Milenia® POCScan Reader, Eingabe der „Calibration- Coefficients“).

	Schritt	
1.		<p>Testeinheit in den Milenia® POCScan Reader einlegen.</p> <p>Die Ausrichtung der Testeinheit in der Schublade beachten!</p>
2.		<p>Die Schublade des Milenia® POCScan Reader schließen!</p> <p>Messung <u>sofort</u> starten.</p>
3.		<p>Nach dem Messen wird das Ergebnis am Bildschirm angezeigt.</p> <p>Die Ergebnisse dürfen nicht später beurteilt werden!</p> <p>Nur gültige Ergebnisse werden angezeigt. Wenn das Ergebnis nicht gültig ist, muss der Test wiederholt werden. Details dem Kapitel „Trouble Shooting“ dem Handbuch des Milenia® POCScan Readers entnehmen. Das Handbuch kann von der Website www.milenia-biotec.de heruntergeladen werden.</p>

Interne Qualitätskontrolle

Die Kontroll-Linie (C) muss immer sichtbar werden!

Sie dient nur als Funktionskontrolle und kann nicht zur Beurteilung der Farbintensität der Testlinie herangezogen werden. Wenn die Kontroll-Linie nach 20 Minuten Inkubationszeit nicht sichtbar ist, ist das Ergebnis ungültig! Der Test muss mit einer neuen Testeinheit wiederholt werden!



Auswertung der Ergebnisse

Während der Messung wird von der Software überprüft, ob der Test gültig ist. Wenn der Test nicht gültig ist, wird kein Messwert angegeben (siehe „Interne Qualitätskontrolle“).

Die im Stimulationsansatz mitgeführte Normalperson sollte als Kontrolle des Experiments in dem unten angegebenen TNF- α Bereich liegen.

Es wird empfohlen, dass jedes Labor die angegebenen Normwerte überprüft bzw. eigene Normwerte ermittelt. Dieser TNF- α Referenzbereich dient nur zur Orientierung.

Generell: Die Resultate sollten immer anhand der gesamten Klinik des Patienten verifiziert werden. Darüber hinaus sollte jede Therapie-Entscheidung individuell getroffen werden.

Erwartete Werte

In einer vorläufigen Normwertstudie wurde heparinisiertes Vollblut von gesunden Normalspendern ($n = 21$) mit dem Milenia[®] QuickLine TNF- α *ex vivo* untersucht.

Folgende TNF- α -Werte wurden in den Überständen ermittelt:

Bereich:	302 bis 1.886 pg/ml
Mittelwert:	926 pg/ml
5% Perzentile:	475 pg/ml
95% Perzentile:	1.789 pg/ml

Testcharakteristika

Probenmaterial:	Zellkulturüberstand
Inkubationszeit:	20 Minuten bei Raumtemperatur (18 – 28 °C)
Messbereich:	200 – 10.000 pg/ml
Sensitivität:	200 pg/ml
Spezifität:	Hochspezifische Reaktion mit humanem TNF- α
Kalibration:	Kalibriert am 2 nd International Standard TNF- α NIBSC 88/786
High-Dose-Hook-Effekt:	Kein High-Dose-Hook-Effekt für Proben unter 1 μ g/ml TNF- α



TNF- α *ex vivo*

Lateral Flow Immunoassay for the quantitative measurement of human TNF- α in cell culture supernatants after LPS stimulation, interpretation by Milenia® POCScan Reader
English: Page 1-8

Lateralfloss-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von humanem TNF- α in Zellkulturüberständen nach LPS-Stimulation, Auswertung mit Milenia® POCScan Reader
Deutsch: Seite 9-16

Immunoassay för lateralflödesteknik avsedd för kvantitativ bestämning av humant TNF- α i cellkultur supernatanter efter LPS stimulering, avläsning med Milenia® POCScan Reader
Svenska: Sidorna 17-22

REF:

MQEVS 1



IVD



Milenia Biotec GmbH
Versailler Str. 1
D-35394 Gießen
Germany










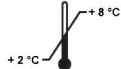

Tel.: +49-641-94 8883-0

Fax: +49-641-94 8883-80

E-mail: info@milenia-biotec.de

<http://www.milenia-biotec.de>

Symbolförklaring

Symbols (GB) Symbole (DE) Symboles (FR) Simboli (IT) Símbolos (ES) Jelölés (HU) Symbole (PL) Σύμβολα (GR) Symbolen (NL) Symboler (S)	Explanation Erklärung Significato Significato Signification Magyarázat Objaśnienia Επαξήγηση Verklaring Förklaring	Symbols (GB) Symbole (DE) Simboli (IT) Símbolos (ES) Symboles (FR) Jelölés (HU) Symbole (PL) Σύμβολα (GR) Symbolen (NL) Symboler (S)	Explanation Erklärung Significato Significato Signification Magyarázat Objaśnienia Επαξήγηση Verklaring Förklaring
	Expiry date Haltbarkeitsdatum Data di scadenza Fecha de caducidad Date d'expiration Lejárati idő Data przydatności Ημερομηνία λήξης Uiterste gebruiksdatum Utgångsdatum		Package size Packungsgröße Numero di test Número de determinaciones Nombre de tests par trousse Kiszerezés nagysága Ilość testów Μέγεθος Συσκευασίας Verpakkingsgrootte Förpackningsstorlek
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device In Vitro Diagnostikum Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Para uso en el Diagnóstico <i>in vitro</i> Diagnostic <i>in vitro</i> In vitro diagnosztikum Do diagnostyki <i>In Vitro</i> In Vitro ιατρική διαγνωστική συσκευή Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek Medicintekninsk utrustning för in vivo diagnostik		Manufacturer Hersteller Produttore Fabricante Fabriqué par Gyártó Producent Παραγωγός Fabrikant Tillverkare
	Batch code Los-Bezeichnung Codice del lotto Lote Numéro de lot Sarzszám Kod partii towaru Αριθμός Παρτίδας Partijnummer Lot nummer		Only for evaluation purposes Nur zur Leistungsbewertung Solo per uso sperimentale Con fines exclusivos de evaluación Pour évaluation uniquement Kizárólag vizsgálati célokra Tylko do oceny produktu Μόνο για λόγους αξιολόγησης Uitsluitend ter evaluatie Endast för utvärdering
REF	Catalogue number Artikel-Nummer Numero di catalogo Referencia Référence Katalógusszám Numer katalogowy Αριθμός Καταλόγου Catalogusnummer Artikelnummer		Consult Instructions for Use Gebrauchsanweisung beachten Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instrucciones de uso Consulter la notice A használati utasítás tanulmányozandó Informacja dla użytkownika Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Raadpleeg de gebruiksaanwijzing Se bruksanvisning
	Storage conditions Lagerungsbedingungen Temperatura di conservazione Temperatura de conservación Température de conservation Tárolási körülmények Temperatura przechowywania Συνθήκες Φύλαξης Bewaarcondities Lagringstemperatur		Consult attended documents Begleitdokumente beachten Consultare i documenti relativi Consultar documentos adjuntos Consulter le document avec attention A csatolt dokumentumok tanulmányozandók Dodatkowe dokumenty Συμβουλευτείτε τα αντίστοιχα έντυπα Raadpleeg bijgevoegde documenten Se bifogad dokumentation

Ingående material, lagring och hållbarhet

Komponenter	Art nr.	Kvantite	Beredning	Förvaras vid	Hållbarhet
Testenhet: Membran belagt med polyklonal (kanin) anti-hTNF- α antikropp; monoklonal (mus) anti-hTNF- α antikropp märkt med guldkonjugat	MQSEV	30 kassetter	Färdig att använda	2 - 8 °C Används omedelbart efter att plastpåsen öppnats!	Till angivet utgångsdatum vid förvaring i försluten plastpåse
Stimuleringsreagens: Lipopolysackarid (LPS)	MREVS	1 vial, 10 ng	Frysorkad; Frysorkad LPS rekonstitueras minst 30 minuter före användning med 1 mL pyrogenfritt destillerat vatten. Blandas noggrant genom att försiktigt vända vialen före användning. Rekonstituerad lösning skall spädas vidare 1:20 med cellodlingsmedium till slutkoncentration på 500 pg/mL (t.ex. 1 mL rekonstituerad LPS lösning i 19 mL Cellodlingsmedia). Av denna lösning pipetteras 500 μ L till 1.5 mL reaktionskoppar.	2-8 °C (frysorkad och rekonstituerad)	Frysorkad: till angivet utgångsdatum Efter rekonstitution: och spädning i 4 veckor vid 2-8°C
Analyscertifikat	CoA-QEVS	1			

Säkerhetsdatablad tillgängliga på anmodan (se även www.milenia-biotec.de).

Material som behövs men inte ingår

- Distillerat, pyrogenfritt vatten
- Cellodlingsmedium RPMI med Glutamin; rekommendation: Biochrom, Berlin/Tyskland, www.biochrom.de (Art. nr. FG 1215)
- Pipetter för 50, 100, 500 och 1000 μ L
- Förslutningsbara (ej nödvändigtvis sterila) reaktionskärl för 1.5 mL; (förslutningsbara sterila) plaströr för spädning
- Inkubator för $37 \pm 1^\circ\text{C}$
- Centrifug för 1,000 g

Provtagning och beredning

För helblodsstimulering används hepariniserat blod som tas enligt gällande anvisningar och föreskrifter. Provet måste vara helt pyrogenfritt och fritt från koagel. Proceduren kräver 50 μ L blod per analys. Blodet kan förvaras i provtagningsröret i rumstemperatur i upp till 8 timmar. Inkubering av provet skall påbörjas inom denna tidsrymd.

Bestämning av TNF- α i stimulerad cellodlingssupernatant skall göras genast efter stimulering. Analysen utförs med 100 μ L prov per test.

Försiktighetsåtgärder

Alla reagens i testkitet är enbart avsett för *in vitro* diagnostisk användning. Personal som använder kitet skall vara särskilt informerad och utbildad för metoder som tillämpas inom *in vitro* diagnostik. Pipetteringssekvenser skall strikt göras enligt anvisningarna i detta dokument.

Provmaterial från patienter (t.ex. serum eller plasma) som normalt förekommer vid laboratoriearbete anses alltid som potentiellt smittfarligt. Prover från riskpatienter skall alltid föras med särskild märkning och om nödvändigt hanteras säkerhetsbänk (t.ex. laminärflödesbänk).

Metodprincip

Milenia[®] QuickLine TNF- α *ex vivo* är en kombination av standardiserad stimulering av humant helblod med lipopolysackarid (LPS) och kvantifiering med en immunoassay lateralflödeskasett för human Tumor-Necrosis-Factor- α (TNF- α) i cellodlingssupernatant.

Prov från hepariniserat helblod inkuberas vid 37°C med en standardiserad stimuleringslösning som innehåller LPS in cellodlingsmedium. Därigenom stimuleras immuncellerna i blodet (särskilt monocyter/makrofager) till att producera cytokiner. Supernatanten centrifugeras och cytokinerna kan mätas. Mängden producerad TNF- α kan i jämförelse med kontrollresultat indikera aktivering eller supression av patienters immunsystem.

Cellodlingssupernatant pipetteras i provbrunnen på lateralflödeskasetten. TNF- α i patientprovet binds till en monoklonal anti-TNF- α antikropp som konjugerats med guldpartiklar. Guldpartiklar med TNF- α diffunderar över membranet och passerar ett testband (T) där en polyklonal antikropp, specifik för TNF- α , är coatad på membranet. Specifikt bundna Guldpartiklar blir synliga som ett rött-blått band. Färgens intensitet är direkt proportionell mot koncentrationen av TNF- α i provet och bandets intensitet ökar under inkuberingstiden. Överskott av guldpartiklar diffunderar vidare över membranet. Konjugatspecifika antikroppar utgör en linje på membranet (kontrollband, C) och fångar upp resterande guldkonjugat, vilket resulterar i en väl synlig linje under inkuberingstiden.

Resultatavläsning kan enbart göras med Milenia[®] POCScan Reader, som ger en objektiv bedömning och dokumentation av resultatet.

Koncentrationen av TNF- α korrelerar direkt till färgintensiteten hos testbandet (T). Milenia[®] POCScan Reader mäter reflektionen av färgen på testbandet. Resultat beräknas från en standardkurva som programmerats i instrumentet.

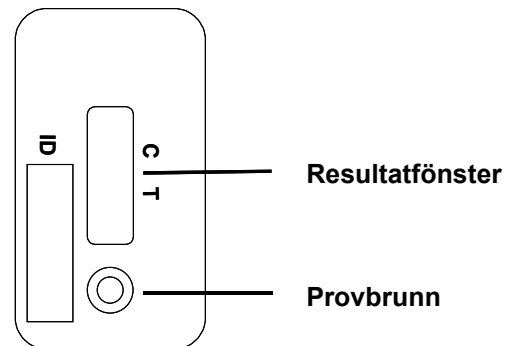
Utförande

- Varning:**
- Blanda aldrig komponenter från kit med olika lot-nummer.
 - Alla komponenter skall ha antagit rumstemperatur (18 – 28 °C) innan de tas i bruk.
 - Alla kitkomponenter levererade som koncentrat skall spädas till avsedd slutkoncentration minst 30 minuter före användning. Blandas väl, men skumbildning undviks.

Som kontroll måste material från normalgivare användas!

Beroende på andra kriterier rekommenderas ytterligare kontroller.


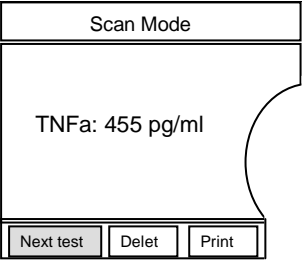
1. Pipettera **500 µL** av beredd stimuleringslösning (LPS, 500 pg/mL) i 1.5 mL reaktionskärl.
2. Tillsätt **50 µL** (varsamt blandat) helblod.
5. Blanda mycket varsamt och inkubera vid 37 ± 1 °C i **4 timmar**.
6. Efter inkubering blandas reaktionsblandningen varsamt och centrifugeras **5 minuter** vid 1,000 x g.
5. Pipettera **100 µL** klar supernatant i provbrunnen på testkassetten.
6. Inkubera testkassetten i **20 minuter** i rumstemperatur.
8. Läs av resultatet **omedelbart efter inkubering** med Milenia® POCSan Reader (se sidan 6).



Prestanda för Milenia® POCScan Reader

Viktiga anmärkningar:

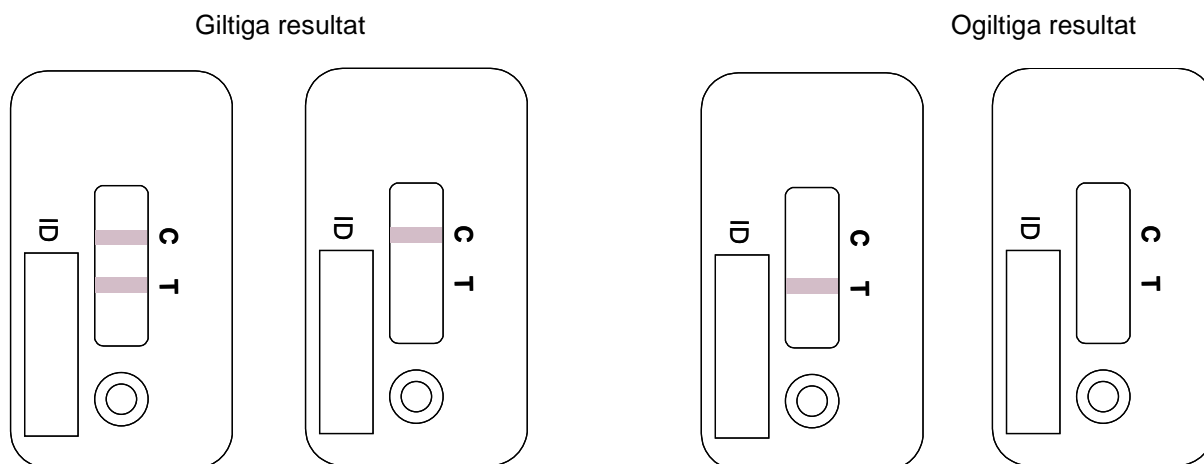
- Innan instrumentet tas i bruk skall denna instruktion samt manualen till Milenia® POCScan Reader läsas noggrant! Följ proceduren steg för steg och lägg märke till sekvensordningen!
- Innan mätning utföres skall lot-nummer på använt kit kontrolleras (se etikett på kartongen). Vid behov importeras uppgifterna från kit-etiketten via RFID-läsaren alternativt kan uppgifterna från analyscertifikatet för aktuellt kit matas in manuellt (se manualen till Milenia® POCScan Reader, mata in kalibreringskoefficienter).

	Steg	
1.		<p>Placera testkassetten i läsaren Milenia® POCScan Reader.</p> <p>Kontrollera att kassetten sitter i rätt position i kasetthållaren!</p>
2.		<p>Skjut in kasetthållaren i läsaren Milenia® POCScan Reader!</p> <p>Starta mätningen omedelbart.</p>
3.		<p>Efter scanning visas resultatet på instrumentets display.</p> <p>Resultat får aldrig avläsas senare!</p> <p>Enbart giltiga resultat visas. Resultat som inte är giltiga måste göras om. För detaljer, se avsnittet "trouble shooting" i manualen för läsaren Milenia® POCScan Reader. Manualen kan laddas ner från www.milenia-biotec.de</p>

Inbyggd kvalitetskontroll

I alla lägen, för giltig test måste kontrollbandet (C) framträda!

Kontrollbandet är endast avsett som funktionskontroll och kan aldrig användas för utvärdering av testbandet. Om kontrollbandet inte framträder efter 20 minuters inkubering är resultatet inte giltigt. Provet måste analyseras om med en ny testkasett.



Tolkning av resultat

Under mätningen kontrolleras att resultaten är giltiga av mjukvaran. Om testet inte är giltigt visas inget resultat för provet (se intern kvalitetskontroll)

Kontrollen från normalgivare för stimuleringen skall överensstämma med de TNF- α -områden som anges på listan nedan.

Varje laboratorium rekommenderas att kontrollera att, alternativt etablerar egna, områdena på nedan lista stämmer med egna referensvärden. De angivna värdena för TNF- α skall enbart anses som förslag.

Allmänt: Resultat skall alltid verifieras med helhetsintrycket av patientens kliniska status. Dessutom skall alla beslut rörande behandling fattas på individuell basis.

Förväntade värden

En preliminär studie på hepariniserat helblod från normalgivare (n = 21) har utförts avseende referensvärden med Milenia[®] QuickLine TNF- α *ex vivo*.

Följande TNF- α -värden fastställdes för cellodlingssupernatant:

Mätområde:	302 till 1,886 pg/mL
Medelvärde:	926 pg/mL
5% Percentilen:	475 pg/mL
95 Percentilen:	1,789 pg/mL

Analytiska prestanda

Prov:	Cellsupernatant
Inkuberingstid:	20 minuter i rumstemperatur (18 - 28 °C)
Mätområde:	200 – 10,000 pg/mL
Nedre detektionsgräns:	200 pg/mL
Specificitet:	Hög specificitet för humant TNF- α
Kalibrering:	Kalibrerad mot 2 nd International Standard TNF- α NIBSC 88/786
Högdos Hook-Effect:	Ej detekterbar för prover under 1 μ g/mL TNF- α