

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

TGF- β 1 ELISA



DE1864



96

Contents / Inhaltsverzeichnis / Contenuti / Contenido / Contenu

1	INTRODUCTION.....	3	1	INTRODUCCIÓN.....	26
2	PRINCIPLE OF THE TEST	3	2	FUNDAMENTO DEL ENSAYO.....	26
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	4	3	PRECAUCIONES.....	26
4	REAGENTS.....	5	4	COMPONENTES DEL KIT	27
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	7	5	MUESTRAS.....	29
6	ASSAY PROCEDURE	8	6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO.....	30
7	EXPECTED NORMAL VALUES.....	9	7	VALORES ESPERADOS	31
8	QUALITY CONTROL	9	8	CONTROL DE CALIDAD.....	31
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	10	9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	31
10	LIMITATIONS OF USE	10	10	LIMITACIONES DE USO.....	32
11	LEGAL ASPECTS	11	11	ASPECTOS LEGALES.....	32
12	REFERENCES / LITERATURE.....	11	12	REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA	32
1	EINLEITUNG.....	12	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS.....		
2	TESTPRINZIP	12	33		
3	VORSICHTSMAßNAHMEN	12			
4	BESTANDTEILE DES KITS	13			
5	PROBENVORBEREITUNG.....	15			
6	TESTDURCHFÜHRUNG	16			
7	ERWARTETE WERTE.....	17			
8	QUALITÄTS-KONTROLLE.....	17			
9	ASSAY CHARACTERISTIKA.....	17			
10	GRENZEN DES TESTS	18			
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	18			
12	REFERENZEN / LITERATUR	18			
1	INTRODUZIONE	19			
2	PRINCIPIO DEL TEST.....	19			
3	PRECAUZIONI.....	19			
4	COMPONENTI DEL KIT	20			
5	CAMPIONI.....	22			
6	ATTUAZIONE DEL TEST.....	23			
7	VALORI NORMALI.....	24			
8	CONTROLLO QUALITÀ.....	24			
9	CARATTERISTICHE DEL TEST.....	24			
10	LIMITAZIONE DEL TEST.....	25			
11	ASPETTI LEGALI.....	25			
12	BIBLIOGRAFIA	25			

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **Demeditec TGF- β 1 ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of TGF- β 1 in serum, plasma and cell culture supernatant.

1.2 Summary and Explanation

Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1) is a 25 kDa Homodimer composed of two 12.5 kDa subunits joined by disulfide bonds (1). TGF- β 1 is a multipotent Cytokine with cell- and dose-dependent activities. This molecule is produced by a number of cells and tissue types, e.g. thrombocytes, bone tissue, placenta and kidneys. This potent Cytokine modulates embryonic development, bone formation, mammary development, wound healing, hematopoiesis, cell cycle progression and the production of the extracellular matrix. With respect to the immune system, TGF- β 1 inhibits T and B cell proliferation and acts as an anti-inflammatory molecule both *in vitro* and *in vivo*. TGF- β 1 inhibits macrophage maturation and activation. This molecule also inhibits the activity of natural killer cells and lymphokine activated killer cells and blocks cytokine production.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DEMEDITEC TGF- β 1 ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the sandwich principle.

Prior to testing the standards and patient samples are diluted in assay buffer, acidified with HCl and then neutralized with NaOH.

Afterwards, the neutralized standards and samples are added to the antibody coated (polyclonal) microtiter wells. After the first incubation the unbound sample material is removed by washing. Then a monoclonal mouse anti TGF- β 1 antibody, a biotinylated anti mouse IgG antibody and the Streptavidin-HRP Enzyme complex are incubated in succession. An immuno enzyme sandwich complex is formed.

After incubation the unbound conjugate is washed off. Having added the substrate solution, the intensity of colour developed is proportional to the concentration of TGF β 1 in the patient sample.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (21 °C - 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 1 N acidic solution. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheets. Material Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DEMEDITEC.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12x8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with anti-TGF- β 1 antibody (polyclonal).
2. **Standard (Stock Standard)**, 1 vial, 2 mL,
Concentration: 600 pg/mL
see „Preparation of Reagents“.
Contain non-mercury preservative.
3. **Assay Buffer, 10X concentrate**, 1 vial, 10 mL,
Concentrations: 0 pg/mL
see „Preparation of Reagents“.
Contains non-mercury preservative.
4. **Antiserum**, 1 vial, 11 mL, ready to use,
monoclonal Mouse anti-TGF- β 1
Contains non-mercury preservative.
5. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 11 mL, ready to use,
anti Mouse IgG conjugated to Biotin.
Contains non-mercury preservative.
6. **Enzyme Complex**, 1 vial, 11 mL, ready to use
Streptavidin Peroxidase
Contains non-mercury preservative.
7. **Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
Tetramethylbenzidine (TMB).
8. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
contains 1 N acidic solution,
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
9. **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated),
see „Preparation of Reagents“.
10. 1 N **HCl**, 1 vial, 3 mL, ready to use,
for acidification of the samples.
11. **Neutralization Buffer**, 1 vial, 3 mL, ready to use;
For neutralization of samples..

Note: Additional *Assay Buffer* for sample dilution is available upon request.

4.2 Materials required but not provided

- 1,5 mL-Reaction Caps (e.g. from Eppendorf) for sample preparation (acidification and neutralization).
- A microtiter plate calibrated reader (450 \pm 10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Distilled or deionized water
- Universal indicator paper.
- Timer
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C - 8 °C unopened reagents, except the *Stock Standard*, will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Immediately after receipt the *Stock Standard* has to be stored frozen at -20 °C.

Opened reagents must be stored at 2 °C - 8 °C, or as described in chapter 4.4.

Microtiter wells must be stored at 2 °C - 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for 6 weeks if stored as described above.

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature prior to use.

Assay Buffer

Dilute 10 mL of concentrated *Assay Buffer* with 90 mL deionized water to a final volume of 100 mL Working Assay Buffer

Standards

Serial Dilution of the ***Stock Standard*** (600 pg/mL):

Description	Concentration
Standard A 1.5 mL Stock Standard	600 pg/mL
Standard B 0.5 mL Standard A + 1.0 mL Assay Buffer	200 pg/mL
Standard C 0.5 mL Standard B + 1.0 mL Assay Buffer	66 pg/mL
Standard D 0.5 mL Standard C + 1.0 mL Assay Buffer	22 pg/mL
Standard E 1.0 mL Assay Buffer	0 pg/mL

Note: The diluted standards are stable for 1 week at 2 °C - 8 °C. For longer storage freeze at -20 °C.

Wash Solution

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution.

Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL deionized water to a final volume of 1200 mL.

The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheet.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DEMEDITEC has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or plasma (EDTA- or citrate plasma) and cell culture supernatant can be used in this assay. Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens. Please note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

5.1 Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti-coagulant (e.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 24 hours at 2 °C to 8 °C prior to assaying. Specimens held for a longer time should be frozen only once at -20 °C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Specimen Dilution

5.3.1 Serum and plasma

Serum and Plasma Samples should be diluted **1:50** with *Assay Buffer* prior to testing. Please note: The results have to be multiplied with the dilution factor (x 50).

Example:

dilution 1:50: 10 μ L Serum + 490 μ L *Assay Buffer* (mix thoroughly)

5.3.2 Cell Culture Samples

Centrifuge the Cell Culture Samples. Dilute the supernatant with *Assay Buffer*, according to the expected TGF- β 1 concentrations, e.g. 1:10, if a high TGF- β 1 concentration is expected. The results have to be multiplied with the dilution factor.

Example:

dilution 1:10: 10 μ L Sample + 90 μ L *Assay Buffer* (mix thoroughly)

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be further diluted with *Assay Buffer* and reassayed as described in Assay Procedure. For the calculation of the concentrations this additional dilution factor has to be taken into account.

5.4 Acidification and Neutralization of Samples and Standards

1. Add **200 μ L Standards** or **prediluted Sample** into Reaction Caps (e.g. Eppendorf-Caps).
Please note: The standards, which have been prepared by serial dilution of the stock standard should also be prepared as described below.
2. Add **20 μ L 1 N HCl** to all caps
3. Close caps, mix thoroughly (vortex) and let stand for 15 minutes
4. For Neutralization add **20 μ L Neutralization Buffer** to all caps and mix the solution.
A pH check and correction of pH is not necessary.
Immediately continue with step 6.2 of assay procedure.

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **100 μ L** of each pretreated **Standard, Control** and **samples** with new disposable tips into appropriate wells.
(Please refer to chapters "Specimen Dilution" and "Acidification and Neutralization of Samples and Standards".)
3. Cover the plate and incubate **over night (8 - 16 hours)** at 4 °C.
Alternative: 3 hours incubation at room temperature.
4. Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells **3 times** with diluted wash solution, 300 μ l per Well. Strike the wells sharply on absorbance paper to remove residual droplets.
Important note: The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
5. Dispense **100 μ L** *Antiserum* into all wells.
6. Incubate **120 minutes** at room temperature.
7. Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells **3 times** with diluted wash solution, 300 μ l per Well. Strike the wells sharply on absorbance paper to remove residual droplets.
8. Dispense **100 μ l** *Enzyme Conjugate* (Anti Mouse Biotin) into each well.
9. Incubate **45 minutes** at room temperature.
10. Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells **3 times** with diluted wash solution, 300 μ l per Well. Strike the wells sharply on absorbance paper to remove residual droplets.
11. Dispense **100 μ l** *Enzyme Complex* into each well.
12. Incubate **45 minutes** at room temperature.
13. Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells **3 times** with diluted wash solution, 300 μ l per Well. Strike the wells sharply on absorbance paper to remove residual droplets.
14. Add **100 μ L** of **Substrate Solution** to each well.
15. Incubate for **15 minutes** at room temperature.
16. Stop the enzymatic reaction by adding **50 μ L** of **Stop Solution** to each well.
17. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 \pm 10 nm** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using semi-logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Multiply the results by the initial dilution factor (for serum serum and plasma samples by 50)
Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as such. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

Data can be obtained by request.

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DEMEDITEC directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 1.9 – 600 pg/mL

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The following substances were tested for cross reactivity of the assay:

Component	Cross reactivity
TGF- β 2	none
TGF- β 3	none
TGF- β 1 (rat)	98%

9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the DEMEDITEC ELISA was calculated by adding 2 standard deviations to the mean of 20 replicate analyses of the *Standard 0* and was found to be 1.9 pg/mL

9.4 Reproducibility

Serum	n	CV %
Intra assay	8	1.0
Inter assay	12	7.5

9.5 Recovery

Recovery: 92,5 % (n=2).

Ca. 93% of the original sample are found in the recovery test.

9.6 Linearity

Plasma samples were diluted with Assay Buffer.

Dilution	measured Concentration
	[pg/ml]
1:30	48,73
1:40	55,19
1:50	56,33
1:60	58,00

10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1 Interfering Substances

Data can be obtained on request.

10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of TGF- β 1 in a sample.

10.3 High-Dose-Hook Effect

Data can be obtained on request.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test. The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DEMEDITEC.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

12 REFERENCES / LITERATURE

1. Kropf, J., Schurek, Josef O., Wollner A. und Gressner, Axel M. Methodological aspects of the immunological measurement of transforming growth factor-beta 1 (TGF-β1) in blood. *Assay development and comparison. Clinical Chemistry* 1997, 43:10.
2. Lawrence Da. Transforming growth factor-beta: An overview. *Kidney Int* 1995;47:S19-S23.
3. Roberts AB, Sporn MB. the transforming growth factor-beta. In: Sporn MB, Roberts AB., eds. *Peptide growth factors and their receptors. Handbook of experimental pharmacology*, Heidelberg: Springer Verlag, 1990:419-472.
4. Kong FM, Anscher MS, Murase T, Abbott BD, Igleheart JD, Jirtle RL. Elevated plasma transforming growth factor-beta 1 levels in breast cancer patients decrease after surgical removal of the tumor. *Ann Surg* 1995;222:155-162.
5. Ito N, Kawata S, Tamura S, et al. Positive correlation of plasma transforming growth factor beta 1 levels with tumor vascularity in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 1995;89:45-48.
6. Muller F, Aukrust P, Nilssen DE, Froland SS. Reduced serum level of transforming growth factor-beta in patients with IgA deficiency. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;76:203-208.
7. Jiang X, Kanai H, Himomura K, Sawamura M, Yano S. Increased intraplatelet and urinary transforming growth factor-beta in patients with multiple myeloma. *Acta Haematol* 1995;94:1-6.
8. Zauli G, Gugliotta L, Catani L. et al. Increased serum levels of transforming growth factor beta-1 in patients affected by thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP): its implications on bone marrow haematopoiesis. *Br. J Haematol* 1993;84:381-386.
9. Taketazu F, Miyagawa K, Ichijo H, et al. Decreased level of transforming growth factor beta in blood lymphocytes of patients with aplastic anemia. *Growth Factors* 1992; 6; 85-90.
10. Snowden N, Coupes B, Herrick A, Illingworth K, Jayson MIV, Brenchley PEC. Plasma TGF beta in systemic sclerosis: A cross-sectional study. *Ann Rheum Dis* 1994;53:763-767.
11. Wakefield LM, Letterio JJ, Chen T, et al. Transforming growth factor-beta 1 circulates in normal human plasma and is unchanged in advanced metastatic breast cancer.

1 EINLEITUNG

Der Demeditec TGF β 1 ELISA wird zur quantitativen Bestimmung von TGF β 1 in Serum, Plasma und Zellkulturproben eingesetzt

Nur für In-vitro Diagnostik.

2 TESTPRINZIP

Der DEMEDITEC TGF- β 1 ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der Sandwichtechnik basiert.

Vor Beginn des ELISA-Tests werden Standards und Proben mit Assaypuffer verdünnt, mit HCL angesäuert und dann mit NaOH neutralisiert.

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem polyklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine definierte Antikörper-Bindungsstelle des TGF- β 1-Moleküls gerichtet ist.

Die vorbehandelten Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und inkubiert. Ungebundenes Probenmaterial wird durch einen Waschschrift entfernt.

Aufeinanderfolgend, mit entsprechenden Waschschriften, wird ein Antiserum (monoklonaler Maus-anti TGF- β -Antikörper, ein Biotin-Enzymkonjugat (anti-Maus-IgG-Antikörper) und ein Streptavidin-HRP Enzymkomplex zugegeben. Es wird ein Sandwichkomplex gebildet.

Nicht gebundenes Konjugat wird durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist proportional der TGF- β 1-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Materialsicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 1 N saure Lösung enthält. Saure Lösung kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Materialsicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DEMEDITEC Diagnostics GmbH erhältlich.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12x8 Wells (einzeln brechbar);
Mit anti-TGF- β 1-Antikörper (polyklonal) beschichtet.
2. **Standard (Stockstandard)**, 1 Fläschchen, 2 mL,
Konzentration: 600 pg/mL
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **Assay Buffer** (Assaypuffer), 10-fach konzentriert, 1 Fläschchen, 10 mL,
Konzentration: 0 pg/mL
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **Antiserum** (Antiserum), 1 Fläschchen, 11 mL, gebrauchsfertig;
monoklonaler Maus-anti-TGF- β 1-Antikörper
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 11 mL, gebrauchsfertig;
Anti-Maus IgG-Antikörper mit Biotin konjugiert.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
6. **Enzyme Complex** (Enzymkomplex), 1 Fläschchen, 11 mL, gebrauchsfertig;
Streptavidin-Peroxidase
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
7. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
Substratlösung TMB.
8. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
enthält 1 N saure Lösung,
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
9. **Wash Solution** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X** konzentriert;
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.
10. 1 N **HCl**, 1 Fläschchen, 3 mL, gebrauchsfertig,
für die Ansäuerung der Proben.
11. **Neutralization Buffer** (Neutralisierungspuffer), 1 Fläschchen, 3 mL, gebrauchsfertig;
Für die Neutralisation der Proben.

Anmerkung: Zusätzlicher *Assay Buffer* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- 1,5 mL-Reaktionsgefäße (z.B. von Eppendorf) zur Vorbereitung der Proben (Ansäuerung und Neutralisation).
- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 ± 10 nm Filter),
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Universal-Indikatorpapier.
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.
- Abdeckfolie

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien, außer dem Stock Standard, behalten bei Lagerung um 2 °C - 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Der Stock Standard muss direkt nach Erhalt bei – 20 °C eingefroren werden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C - 8 °C, oder wie unter Kapitel 4.4 beschrieben, gelagert werden.

Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C - 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits 6 Wochen ihre Reaktivität.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

Assay Buffer

Den Inhalt des Fläschchens (10x konz.) mit 90 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 mL verdünnen. Die ist der gebrauchsfertige Assaypuffer.

Standards

Serielle Verdünnung des **Stock Standard** (600 pg/mL):

Beschreibung	Konzentration
Standard A 1.5 mL Stock Standard	600 pg/mL
Standard B 0.5 mL Standard A + 1.0 mL Assay Buffer	200 pg/mL
Standard C 0.5 mL Standard B + 1.0 mL Assay Buffer	66 pg/mL
Standard D 0.5 mL Standard C + 1.0 mL Assay Buffer	22 pg/mL
Standard E 1.0 mL Assay Buffer	0 pg/mL

Achtung: Bei 2 °C - 8 °C sind die verdünnten Standards 1 Woche haltbar. Für eine längere Aufbewahrung bei -20 °C einfrieren.

Wash Solution

Die 40-fach konzentrierte *Wash Solution* (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen.

Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Material Sicherheitsdatenblatt, Kapitel 13.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DEMEDITEC in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENVORBEREITUNG

Serum oder Plasma (EDTA- oder Zitratplasma) und Zellkultur-Überstand kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Lipämische, ikterische und/oder stark hämolysierte Proben sollten nicht verwendet werden.

Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

5.1 Probenentnahme

Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Plasma:

Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulant enthalten (z.B.: Sarstedt Monovette – mit entsprechender Plasma-Präparierung). Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 24 Stunden bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Für eine längere Aufbewahrung sollten die Proben eingefroren bei –20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

5.3 Probenverdünnung

5.3.1 Serum und Plasma

Serum- und Plasmaproben müssen vor dem Testansatz **1:50** mit gebrauchsfertigem Assaypuffer verdünnt werden.

Anmerkung: Die ermittelten Ergebnisse müssen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor (x50) multipliziert werden.

Beispiel:

Verdünnung 1:50: 10 µL Sample + 490 µL Assay Buffer (gründlich mischen).

5.3.2 Zellkulturproben

Zellkulturproben kurz zentrifugieren und den Überstand entsprechend der zu erwartenden Konzentration verdünnen, z.B. 1:10 bei niedrigen TFG-β1 Konzentrationen.

Die ermittelten Ergebnisse mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multiplizieren.

Beispiel:

Verdünnung 1:10: 10 µL Sample + 90 µL Assay Buffer (gründlich mischen)

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Assay Buffer* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die weitere Verdünnung muss ebenfalls bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

5.4 Ansäuerung und Neutralisation von Patientenproben und Standards

- 200 µL vorverdünnte Probe bzw. Standards in 1,5 ml-Reaktionsgefäße (z.B. Eppendorf-Cups) geben.
Bitte beachten: Auch die durch serielle Verdünnung des Stock-Standards erhaltenen Standards müssen nach dieser Vorschrift behandelt werden.
- Je 20 µL 1 N HCl hinzugeben.
- Gefäß verschließen, gründlich mischen (vortexen) und 15 Minuten stehen lassen.
- Zur Neutralisierung 20 µL *Neutralization Buffer* hinzufügen; gut mischen.
Eine pH-Wert-Überprüfung und -Korrektur ist nicht erforderlich.
Bitte sofort mit der Testdurchführung (siehe Kap. 6.2) fortfahren.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 100 μ L vorbehandelte Standards, Control und Proben mit neuen Plastikspitzen** in die entsprechenden Wells geben.
(Hierzu bitte die Kapitel „Probenverdünnung“ und „Ansäuerung und Neutralisation von Patientenproben und Standards“ beachten.)
3. Platte abdecken und **über Nacht (8-16 Stunden)** bei 4 °C inkubieren.
Alternativ kann die Platte 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert werden.
4. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **3mal** mit verdünnter *Wash Solution* (300 μ L) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
5. **100 μ L Antiserum** in jedes Well geben.
6. Bei Raumtemperatur für **120 Minuten** inkubieren.
7. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **3-mal** mit verdünnter *Wash Solution* (300 μ L) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
8. **100 μ L Enzyme Conjugate** (Anti-Maus-Biotin) in jedes Well geben.
9. Bei Raumtemperatur für **45 Minuten** inkubieren.
10. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **3-mal** mit verdünnter *Wash Solution* (300 μ L) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
11. **100 μ L Enzyme Complex** in jedes Well geben.
12. Bei Raumtemperatur für **45 Minuten** inkubieren.
13. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **3-mal** mit verdünnter *Wash Solution* (300 μ L) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
14. **100 μ L Substrate Solution** in jedes Well geben.
15. Bei Raumtemperatur für **15 Minuten** inkubieren.
16. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 μ L Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
17. Die Optische Dichte bei **450 \pm 10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der *Stop Solution* bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics, 4 Parameter Rodbard) bestimmt. Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Das Ergebnis muss mit dem entsprechend Verdünnungsfaktor (bei Serum und Plasma x 50) multipliziert werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

7 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

Daten sind auf Anfrage verfügbar.

8 QUALITÄTS-KONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungünstig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

9 ASSAY CHARACTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 1,9 – 600 pg/mL

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert plus der zweifachen Standardabweichung des *Standards 0* (n = 20), beträgt 1,9 pg/mL.

Die Daten zu:

9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

10 GRENZEN DES TESTS

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Interferenzen

Daten sind auf Anfrage verfügbar.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des TGF-β1-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

10.3 High-Dose-Hook Effekt

Daten sind auf Anfrage verfügbar.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1. genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2. erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

12 REFERENZEN / LITERATUR

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

1 INTRODUZIONE

Il test immuno-enzimatico **Demeditec TGF- β 1 ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa di fattore di crescita trasformante β 1 (TGF- β 1) in siero, plasma e campioni di colture cellulari.

Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test kit Demeditec TGF- β 1 ELISA è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati su un substrato (ELISA) basato sul principio sandwich.

Prima di eseguire il test, gli standard e i campioni dei pazienti vengono diluiti nel tampone del test, acidificato con HCl e poi neutralizzato con NaOH.

Dopo, gli standard neutralizzati e i campioni sono aggiunti ai pozzetti ricoperti con l'anticorpo (policlonale)

Dopo la prima incubazione il materiale non legato viene rimosso da un passaggio di lavaggio. Dopo, un anticorpo monoclonale di topo anti TGF- β , un anticorpo anti murino IgG biotinilato e il complesso enzima streptavidina-HRP sono incubati in secessione. Si forma un complesso immunoenzimatico a sandwich.

Dopo l'incubazione il coniugato non legato è eliminato attraverso lavaggi.

Dopo l'aggiunta della soluzione substrato l'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di TGF- β 1 nel campione del paziente

3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.
- Informazioni su sostanze pericolose contenute nel kit sono riportate nel regolamento di sicurezza.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la *Stop Solution* dovrebbe essere evitato perché contiene 1 N acido soluzione. L'acido soluzione può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati immagazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta DEMEDITEC Diagnostics GmbH.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

1. **Microtiterwells** (Micropozetti), 12x8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti; Pozzetti ricoperti con l'anti- TGF-β1 anticorpo (policlonale)
2. **Standard (Stock Standard)**, 1 flacone, 2 mL, stock conc., Concentrazione: 600 pg/mL
Vedi "preparazione dei reagenti".
Contiene conservante senza mercurio.
3. **Assay Buffer 10X concentrate** (Tampone del test, concentrato 10X), 1 flacone, 10 mL; Concentrazione: 0 pg/mL
Vedi "preparazione dei reagenti".
Contiene conservante senza mercurio.
4. **Antiserum** (Antisiero), 1 flacone, 11 mL, pronto all'uso; anti-TGF-β1 monoclonale di topo;
Contiene conservante senza mercurio.
5. **Enzyme Conjugate** (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 11 mL, pronto all'uso
IgG anti-topo coniugato alla biotina.
Contiene conservante senza mercurio.
6. **Enzyme Complex** (Complesso enzimatico), 1 flacone, 11 mL, pronto all'uso; perossidasi di streptavidina;
Contiene conservante senza mercurio.
7. **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; TMB (benzidine tetrametilico).
8. **Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; contiene 1 N acido soluzione.
Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
9. **Wash Solution** (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (concentrata 40X); vedi „preparazione dei reagenti“.
10. 1 N **HCl**, 1 flacone, 3 mL, pronto all'uso, per la acidificazione dei campioni.
11. **Neutralization Buffer**, 1 flacone, 3 mL, pronto all'uso; per la neutralizzazione

Nota: Ulteriore *Assay Buffer* per la diluizione dei campioni può essere richiesto alla ditta.

4.2 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- 1,5 mL provette da reazione (p.es. Eppendorf) per la preparazione dei campioni (acidificazione e neutralizzazione).
- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450 ± 10 nm)
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile.
- Carta assorbente.
- Acqua distillata.
- Carta indicatore universale.

4.3 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2 °C - 8 °C i reagenti, eccetto lo *Stock Standard*, non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data.

Lo stock dello Standard (*Stock Standard*) deve essere congelato a -20 °C immediatamente dopo la ricevuta.

Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2 °C - 8 °C.

I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C - 8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente.

Test kits aperti rimangono attivi per 6 settimane se magazzinati alle condizioni sopra descritte.

4.4 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente.

Assay Buffer

Diluire 10 mL del tampone d'analisi concentrato (*Assay Buffer*) con 90 mL di acqua deionizzata ad un volume finale di 100 mL di tampone d'analisi operante.

Standards

Diluizione seriale dello **Stock Standard** (600 pg/mL):

<u>Descrizione</u>	<u>concentrazione</u>
Standard A 1.5 mL Stock Standard	600 pg/mL
Standard B 0.5 mL Standard A + 1.0 mL Assay Buffer	200 pg/mL
Standard C 0.5 mL Standard B + 1.0 mL Assay Buffer	66 pg/mL
Standard D 0.5 mL Standard C + 1.0 mL Assay Buffer	22 pg/mL
Standard E 1.0 mL Assay Buffer	0 pg/mL

Nota: Gli standard diluiti sono stabili per 1 settimana a 2 °C - 8 °C. Per periodi piu' lunghi congelare a -20 °C.

Wash Solution

Diluire 30 mL *Wash Solution* concentrata con 1170 mL di acqua deionizzata fino ad un volume finale di 1200 mL.

La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 2 settimane a temperatura ambiente.

4.5 Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit deve avvenire secondo le regole a norma di legge. Informazioni particolareggiate per questo prodotto si trovano nel regolamento di sicurezza, capitolo 13.

4.6 Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta DEMEDITEC, al piu' tardi una settimana dopo il ricevimento del kit. Componenti danneggiati non dovrebbero essere utilizzati per il test. Questi componenti devono essere magazzinati fino alla soluzione del problema. Dopo di che essi devono essere smaltiti secondo le norme ufficiali.

5 CAMPIONI

Siero o plasma (EDTA-- or citrate plasma) e colture cellulari può essere usato per questo test.

Non usare campioni emolitici, itterici o lipemici.

Attenzione: Se i campioni contengono sodio azide non devono essere utilizzati per questo test.

5.1 Collezione dei campioni

Siero:

Collezionare sangue tramite puntura venale (p.es. Sarstedt Monovette per siero), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente.

Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti con una terapia anticoagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

Plasma:

Il sangue dovrebbe essere collezionato in tubetti da centrifuga contenenti un anticoagulante (p. es. Sarstedt Monovette con un'adeguata preparazione per il plasma) e centrifugando immediatamente dopo la puntura.

5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere magazzinati ben chiusi fino a 24 ore a 2 °C a 8 °C.

Campioni magazzinati per un periodo più lungo dovrebbero essere congelati solo una volta a -20 °C prima dell'analisi. Congelare soltanto una volta. Invertire campioni scongelati alcune volte prima dell'uso.

5.3 Diluizione dei campioni

5.3.1 Siero e plasma

Siero e plasma deve essere diluito **1:50** con il tampone del test (*Assay Buffer*) prima dell'analisi.

Nota bene: i risultati devono essere moltiplicati con il fattore di diluizione (x50).

Esempio:

diluizione 1:50: 10 µL siero + 490 µL *Assay Buffer* (agitare bene)

5.3.2 Campioni di colture cellulari

Centrifugare le colture cellulari. Diluire il surnatante con il tampone del test (*Assay Buffer*) secondo le concentrazioni di TGF-β1 aspettata nel campione, p.es. 1:10 se una alta concentrazione di TGF-β1 e' aspettata.

I risultati devono essere moltiplicati con il fattore di diluizione.

Esempio:

diluizione 1:10: 10 µL siero + 90 µL *Assay Buffer* (agitare bene)

Se in un campione di siero viene trovata una concentrazione oltre lo standard più alto, questo campione può essere diluito *Assay Buffer* e nuovamente determinato.

Della diluizione deve essere però tenuto conto.

5.4 Acidificazione e neutralizzazione dei campioni e degli standard

1. Aggiungere 200 µL degli standard o dei campioni **diluiti** nelle provette (p.es. Tubetti Eppendorf).

Nota bene: Gli standard che sono stati preparati tramite diluizione seriale dello stock devono essere trattati come descritto sotto.

2. Aggiungere 20 µL 1 N HCl ad ogni provetta.

3. Chiudere le provette, mescolare accuratamente (vortex) e lasciar riposare per 15 minuti.

4. Per la neutralizzazione aggiungere **20 µL *Neutralization Buffer*** a tutti i tubetti e mescolare la soluzione.

Revisione e correzione del valore del pH non è necessaria.

Immediatamente continuare con il punto 6.2 "Eseguimento del test".

6 ATTUAZIONE DEL TEST

6.1 Indicazioni generali

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente e ben mescolati prima dell'uso. Evitare la formazione di schiume.
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.

6.2 Eseguito del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Pipettare **100 µL** di ogni **Standard, Control** e **campione pre-trattati** nei pozzetti, cambiando ogni volta la punta monouso.
(Si prega di riferirsi al capitolo "Diluizione dei campioni" e "Acidificazione e neutralizzazione dei campioni e degli standard")
3. Coprire la piastra e incubare **tutta la notte (8 - 16 ore)** a 4 °C.
In alternativa: 3 ore incubazione a temperatura ambiente.
4. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **3 volte** con *Wash Solution* diluita (300 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
Importante: La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto eseguito del lavaggio!
5. Pipettare **100 µL Antiserum** in ogni pozzetto.
6. Incubare per **120 minuti** a temperatura ambiente
7. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **3 volte** con *Wash Solution* diluita (300 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
8. Pipettare **100 µL Enzyme Conjugate** in ogni pozzetto.
9. Incubare per **45 minuti** a temperatura ambiente
10. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **3 volte** con *Wash Solution* diluita (300 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
11. Pipettare **100 µL Enzyme Complex** in ogni pozzetto.
12. Incubare per **45 minuti** a temperatura ambiente.
13. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **3 volte** con *Wash Solution* diluita (300 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
14. Aggiungere **100 µL** della *Substrate Solution* ad ogni pozzetto.
15. Incubare per **15 minuti** a temperatura ambiente.
16. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **50 µL** della *Stop Solution* ad ogni pozzetto.
17. Determinare la densità ottica a **450 ± 10 nm** con un fotometro per microtiter-piastre **entro 10 minuti** dopo l'aggiunta della *Stop Solution*.

6.3 Rilevamento dei risultati

1. Determinare i valori medi della densità ottica per ogni set di standard, controlli e campioni.
2. Costruire una curva standard: riportare i valori medi della densità ottica (OD) di ogni standard contro la rispettiva concentrazione dove i valori delle OD si devono trovare sull'asse verticale (Y) e le concentrazioni sull'asse orizzontale (X).
3. Utilizzando il valore medio delle OD per ogni campione si determina la rispettiva concentrazione dalla curva standard.
4. Metodo automatico: I risultati in IFU sono stati calcolati automaticamente usando un (fitting) avvicinamento con il 4 PL (4 Parameter Logistics). Altri funzioni usati per l'elaborazioni dei dati possono dare risultati leggermente differenti.
5. La concentrazione dei campioni può essere determinata direttamente dalla curva standard.
Moltiplicare i risultati con il loro fattore di diluizione (per campioni di siero e di plasma con 50)
Campioni con una concentrazione piu' elevata dello standard piu' concentrato devono essere diluiti. Di questo fattore di diluizione deve essere tenuto conto per il calcolo della concentrazione.

7 VALORI NORMALI

È consigliabile che ogni laboratorio determini i propri valori normali e anormali.

Dati possono essere forniti su richiesta.

8 CONTROLLO QUALITÀ

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge. Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno. Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.

Le referenze con i rispettivi risultati del laboratorio QC sono elencati nel QC certificato, che è allegato al kit. I valori riportati nel QC certificato si riferiscono al lotto del kit attuale e dovrebbero essere utilizzati per un raffronto dei risultati.

Appropriati metodi statistici per l'analisi dei valori controllo e delle rappresentazioni grafici dovrebbero essere adoperati. Nel caso che i risultati del test non combaciano con il campo di accettazione indicato dal materiale di controllo, i risultati dei pazienti devono essere considerati invalidi. In questo caso si prega di controllare i seguenti fattori d'errore: pipette, cronometri, fotometro, data di scadenza dei reagenti, condizione di magazzinaggio e d'incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio.

Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DEMEDITEC.

9 CARATTERISTICHE DEL TEST

9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 1,9 – 600 pg/mL

9.2 Specificità degli anticorpi (reazioni ad incrocio)

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.3 Sensitività analitica

La sensitività analitica è stata calcolata dai valori medi piu' due deviazioni standard di venti (20) repliche dello *Standard 0* ed erano 1,9 pg/mL.

9.4 Precisione

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.5 Ritrovato

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.6 Linearità

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

10 LIMITAZIONE DEL TEST

Ogni manutenzione impropria dei campioni o modificazione del protocollo può influenzare I risultati.

10.1 Sostanze interferenti

Dati possono essere forniti su richiesta.

10.2 Droghe interferenti

Fino ad oggi nessuna sostanza (farmaco) è conosciuta a noi che abbia influenzato la determinazione di TGF- β 1 nel campione.

10.3 Effetto Hook di alti dosaggi

Dati possono essere forniti su richiesta.

11 ASPETTI LEGALI

11.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test. I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DEMEDITEC.

11.2 Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente. Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche. Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

11.3 Responsabilità legali

Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento. Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2. Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

12 BIBLIOGRAFIA

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

1 INTRODUCCIÓN

El **Kit de inmunoensayo enzimático DEMEDITEC TGF-β1** proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del Factor de crecimiento transformante β1 (TGF- β1) en suero, plasma y muestras de células en cultivo .

Este ensayo está diseñado solo para diagnóstico *in vitro*.

2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit DEMEDITEC TGF- β1 ELISA es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el principio del sándwich.

Antes del ensayo, los estándares y las muestras de los pacientes han de diluirse en tampón de ensayo, acidificarse con HCl y después neutralizarse con NaOH.

Después, los estándares y las muestras neutralizadas se adicionan a los pocillos de las placas multipocillo recubiertas con anticuerpo (policlonal).

Después de la primera incubación, el material no unido de las muestras se retira mediante lavado.

Entonces se incuban sucesivamente un anticuerpo monoclonal de ratón anti-TGF-β1, un anticuerpo IgG anti-ratón biotinilado el complejo enzimático estreptavidina-HRP. Se forma un complejo inmunológico en sandwich.

Después de la incubación se lava el conjugado que no se ha unido. Cuando se añade la solución del sustrato de la peroxidasa, la intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de TGF-β1 en la muestra del paciente.

3 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*.
- Por favor, se usa solo la versión válida de la metodología técnica incluido aquí en el kit.
- Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
- Evitar contacto con *Stop Solution* que contiene 1 N ácido solución. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
- No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
- Usar guantes de látex cuando se utilicen las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede dar resultados erróneos.
- El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
- Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar diferentes.
- Los compuestos químicos y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- Las hojas de los datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a DEMEDITEC Diagnostics GmbH.

4 COMPONENTES DEL KIT

4.1 Componentes del Kit

1. **Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12 x 8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti-TGF β1 (policlonal).
2. **Standard (Stock Standard)**, (Estándar, Solución madre), 1 vial, 2 mL; Concentración: 600 pg/mL
Ver "Preparación de los Reactivos";
Contiene conservante sin mercurio.
3. **Assay Buffer, 10X concentrate**, 1 vial, 10 mL
Referir los valores y rangos del control a la etiqueta del vial o a la Hoja de datos QC.
Concentraciones: 0 pg/mL
Ver "Preparación de los Reactivos";
Contiene conservante sin mercurio.
4. **Antiserum** (Antisuero), 1 vial, 11 mL, listo para usar, anticuerpo monoclonal de ratón anti-TGF-β1.
Contiene conservante sin mercurio.
5. **Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático), 1 vial, 11 mL, listo para usar, anticuerpo antirratón IgG conjugado con biotina.
Contiene conservante sin mercurio.
6. **Enzyme Complex** (Complejo enzimático), 1 vial, 11 mL, listo para usar, estreptavidina peroxidasa.
Contiene conservante sin mercurio.
7. **Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 14 mL, listo para usar, Tetrametilbencidina (TMB).
8. **Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar, contiene 1 N ácido solución.
Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en la piel.
9. **Wash Solution** (Solución de lavado), 1 vial, 30 mL (concentrado 40X), ver "Preparación de los Reactivos".
10. **1 N HCl**, 1 vial, 3 mL, listo para usar, para la preparación de la muestra (acidificación)
11. **Neutralization Buffer**, 1 vial, 3 mL, listo para usar, para la neutralización

Nota: Se puede solicitar el *Assay Buffer* para la dilución de la muestra.

4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Tubos de 1,5 mL (ej. Eppendorf) para la preparación de la muestra (acidificación y neutralización).
- Lector de microplacas calibrado (450 ±10 nm)
- Micropipetas de precisión variable calibradas.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.
- Papel indicador universal de pH

4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2 °C - 8 °C, los reactivos, excepto del stock standard, sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha.

Inmediatamente después el recibo del kit el stock standard hay que congelarse a unos -20°C

Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 °C - 8 °C, o como véase en el capítulo 4.4.

Las placas multipocillo han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo.

Los kits abiertos conservan su actividad durante 6 meses si se almacenan como se ha descrito arriba.

4.4 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente antes de usarse.

Assay Buffer

Diluir 10 mL del tampón de ensayo (*Assay Buffer*) concentrado con 90 mL de agua desionizada hasta un volumen final de 100 mL de tampón de ensayo de trabajo.

Standards

Hacer diluciones seriadas del estándar madre (**Stock Standard**) (600 pg/mL):

Descripcion	concentracion
Standard A 1.5 mL Stock Standard	600 pg/mL
Standard B 0.5 mL Standard A + 1.0 mL Assay Buffer	200 pg/mL
Standard C 0.5 mL Standard B + 1.0 mL Assay Buffer	66 pg/mL
Standard D 0.5 mL Standard C + 1.0 mL Assay Buffer	22 pg/mL
Standard E 1.0 mL Assay Buffer	0 pg/mL

Nota: Los estándares diluidos son estables durante 1 semana a 2 °C - 8 °C. Para períodos de tiempo más largos almacenar congelados a -20 °C.

Wash Solution

Mezclar 30 mL de *Wash Solution* concentrada con 1170 mL de agua desionizada hasta un volumen final de 1200 mL.

La solución del lavado diluida es estable durante 2 semanas a temperatura ambiente.

4.5 Eliminación del Kit

La eliminación del kit debe realizarse de acuerdo con las leyes nacionales. En las hojas de datos de seguridad se proporciona información especial de este producto (ver capítulo 13).

4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a DEMEDITEC, no más tarde de una semana después de recibir el kit. No deben utilizarse componentes dañados para llevar a cabo un ensayo. Han de almacenarse hasta que se encuentre una solución. Después de esto, deben ser eliminados de acuerdo con las leyes oficiales.

5 MUESTRAS

En este ensayo pueden usarse suero, plasma (plasma EDTAo citrato) o muestras de las células en cultivo. No usar muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas.

Tener en cuenta: No deben usarse muestras que contengan acida sódica.

5.1 Toma de muestras

Suero:

Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette para el suero), permitir coagulación, y separar el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugar antes de la coagulación completa. Las muestras de pacientes que reciben terapia anticoagulante requieren más tiempo para coagular.

Plasma:

Toda la sangre ha de recogerse en tubos de centrífuga que contengan anticoagulante (Ej. Sarstedt Monovette con una preparación adecuada para el plasma) y centrifugar inmediatamente tras la recogida.

5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 24 horas a 2 °C a 8 °C antes del ensayo. Las muestras almacenadas por un período de tiempo mas largo han de congelarse sólo una vez a -20 °C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

5.3 Dilución de las muestras

5.3.1 Suero y plasma

Las muestras de suero y plasma deben diluirse 1:50 con tampón de ensayo (*Assay Buffer*) antes de ensayarse.

Porfavor, tener en cuenta: Los resultados han de multiplicarse por el factor de dilución (x 50).

Ejemplo:

dilución 1:50: 10 µL Suero + 490 µL *Assay Buffer* (mezclar totalmente)

5.3.2 Muestras de células en cultivo

Centrifugar las muestras de las células en cultivo. Diluir el sobrenadante con tampón de ensayo (*Assay Buffer*), de acuerdo con la concentración esperada de TGF-β1, ej. 1:10, si se espera una concentración elevada de TGF-β1.

Los resultados han de multiplicarse por el factor de dilución.

Ejemplo:

dilución 1:10: 10 µL Suero + 90 µL *Assay Buffer* (mezclar totalmente)

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el estándar mas concentrado, ha de diluirse con *Assay Buffer* y volver a ensayarse como se describe en el Procedimiento de Ensayo.

Para el cálculo de las concentraciones habrá que tener en cuenta el factor de dilución.

5.4 Acidificación y neutralización de las muestras y los estándares

1. Adicionar 200 µL de estándares o de la muestra **prediluida** en los tubos de reacción (ej. Tubos eppendorf) **Por favor, tener en cuenta:** Los estándares, que han sido preparados por dilución seriada de la solución estandar madre, también deben prepararse como se describe debajo.
2. Adicionar 20 µL de HCl 1N a todos los tubos
3. Cerrar los tubos, mezclar completamente (vortex) y dejar durante 15 minutos
4. Para la neutralización añadir **20 µL *Neutralization Buffer*** a todos los tubos y mezclar la solución. Revisión y corrección del pH no es necesario.
Inmediatamente continuar con paso 6.2 "Procedimiento de ensayo".

6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada estándar, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La absorbancia es función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.

6.2 Procedimiento de ensayo

Cada uno debe incluir una curva de estándares.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **100 µL** de cada **Standard** (pretratar), **Control** (pretratar) y **muestras** (pretratar) con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
(Por favor, consultar los capítulos: "Dilución de la muestra" y "Acidificación y Neutralización de las muestras y los estándares".)
3. Cubrir la placa e incubar durante toda la noche (8-16 horas) a 4 °C.
Alternativa: Incubación a temperatura ambiente durante 3 horas.
4. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
Lavar los pocillos **3 veces** con *Wash Solution* diluida (300 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
Nota importante:
La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!
5. Dispensar **100 µL** de *Antiserum* a cada pocillo.
6. Incubar durante **120 minutos** a temperatura ambiente.
7. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
Lavar los pocillos **3 veces** con *Wash Solution* diluida (300 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
8. Dispensar **100 µL** de *Enzyme Conjugate* a cada pocillo.
9. Incubar durante **45 minutos** a temperatura ambiente.
10. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
Lavar los pocillos 3 veces con *Wash Solution* diluida (300 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
11. Dispensar **100 µL** de *Enzyme Complex* a cada pocillo.
12. Incubar durante **45 minutos** a temperatura ambiente.
13. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
Lavar los pocillos 3 veces con *Wash Solution* diluida (300 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
14. Adicionar **100 µL** de *Substrate Solution* a cada pocillo.
15. Incubar durante **15 minutos** a temperatura ambiente.
16. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **50 µL** de *Stop Solution* a cada pocillo.
17. Leer la OD a **450 ± 10 nm** con un lector de microplacas **dentro de los 10 minutos** después de la adición de la *Stop Solution*.

6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de absorbancia media para cada conjunto de estándares, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar mediante la representación de la absorbancia media obtenida para cada estándar frente a su concentración con el valor de absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de absorbancia media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en la IFU se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 PL (4 Parámetros Logísticos). Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de la muestra puede leerse directamente de la curva de estándares. Multiplicar los resultados por el factor de dilución inicial (para las muestras de suero y plasma por 50)
Las muestras con concentraciones superiores al mayor estándar han de diluirse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.

7 VALORES ESPERADOS

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus valores normales e inusuales.

Esta información puede obtenerse bajo pedido

8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control se recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico.

Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados. Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos.

En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado.

Después de comprobar los asuntos mencionados arriba sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DEMEDITEC directamente.

9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 1.9 – 600 pg/mL

9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.3 Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica se calculó a partir de la media mas dos desviaciones estándar de veinte (20) réplicas del *Estándar 0* y resultó ser 1.9 pg/mL.

9.4 Precisión

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.5 Recuperación

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.6 Linealidad

Consultar el manual de usuario en inglés.

10 LIMITACIONES DE USO

Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificaciones del ensayo pueden influenciar los resultados.

10.1 Sustancias que pueden interferir

Esta información puede obtenerse bajo pedido

10.2 Interferencias con drogas

Hasta ahora no se han encontrado sustancias (drogas) conocidas por nosotros, que tengan influencia en la medida de TGF β 1 en una muestra.

10.3 Efecto Gancho-Dosis-Elevada

Esta información puede obtenerse bajo pedido

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo.

Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DEMEDITEC.

11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente.

Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.

Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

11.3 Responsabilidad











Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalida cualquier reclamación de reposición.











Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

12 REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA

Consultar el manual de usuario en inglés.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenu	Contenido	Contenuto
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Numéro	Volumen/Número	Volume/Quantità
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Plaques de microtitration	Placas multipocillo	Micropozzetti
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisérum	Antisuero	Antisiero
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complexe enzymatique	Complex enzimático	Complesso enzimatico
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de parada	Soluzione d'arresto
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Zero Standard	Estándar cero	Standard zero
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Contrôle	Control	Controllo
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampon d'essai	Tampón de ensayo	Tampone del test
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1N HCl	1 N HCl	
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungsmedium	Solution pour dilution de l'échantillon	Solución para dilución de la muestra	Diluyente dei campioni
<i>Neutralization Buffer</i>	Neutralization Buffer	Neutralisationspuffer			

Symbol	Portugues	Dansk	Svenska	Ελληνικά
	Conformidade com as normas europeias	Europaeisk overensstemmelse	Europeisk överensstämmelse	Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση
	Consulte as instruções de utilização	Se brugsanvisning	Se bruksanvisningen	Εγχειρίδιο χρήστη
	Diagnóstico in vitro	In vitro diagnostik	Diagnostik in vitro	in vitro διαγνωστικό
				
	Catálogo n.º	Katalognummer	Katalog nummer	Αριθμός καταλόγου
	No do lote	Lot nummer	Batch-nummer	Αριθμός Παρτίδος
		Indeholder tilstrækkeligt til "n" test	Innehåller tillräckligt till "n" tester	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
	Temperatura de conservação	Opbevaringstemperatur	Förvaringstemperatur	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Prazo de validade	Udløbsdato	Bäst före datum	Ημερομηνία λήξης
	Fabricante	Producent	Tillverkare	Κατασκευαστής
<i>Distributed by</i>				
<i>Content</i>	Conteúdo	Indhold	Innehåll	Περιεχόμενο
<i>Volume/No.</i>	Volume/Número	Volumen/antal	Volym/antal	Όγκος/αριθ..
<i>Microtiterwells</i>	Alvéolos de microtitulação	Mikrotiterbrønde	Brunnar i Mikrotiterplatta	Πηγαδάκια Μικροπιλοδοτήσεως
<i>Antiserum</i>	Anti-soro	Antiserum	Antiserum	Αντιορός
<i>Enzyme Conjugate</i>	Conjugado enzimático	Enzymkonjugat	Enzymkonjugat	Συζευγμένο ενζυμο
<i>Enzyme Complex</i>	Complexo enzimático	Enzymkompleks	Enzymkomplex	Σύμπλοκο ενζύμου
<i>Substrate Solution</i>	Solução de substrato	Substratopløsning	Substratlösning	Διάλυμα υποστρώματος
<i>Stop Solution</i>	Solução de paragem	Stopopløsning	Stopp lösning	Διάλυμα τερματισμού
<i>Zero Standard</i>	Padrão zero	Standard 0	Standard 0	Πρότυπο Μηδέν
<i>Standard</i>	Calibrador	Standard	Standard	Πρότυπα
<i>Control</i>	Controlo	Kontrol	Kontroll	Έλεγχος
<i>Assay Buffer</i>	Tampão de teste	Assay buffer	Assay Buffer	Ρυθμιστικό Διάλυμα Εξέτασης
<i>Wash Solution</i>	Solução de lavagem	Vaskebuffer	Tvätt lösning	Διάλυμα πλύσεως
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1 N HCl	1 N HCl
<i>Sample Diluent</i>				
<i>Conjugate Diluent</i>				