



## Instructions for Use

# TGF- $\beta$ 2 ELISA

IVD



REF EIA-2396



96



**DRG**

**DRG Instruments GmbH**, Germany  
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg  
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50  
Website: [www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)

Distributed by:

**DRG**

**DRG International, Inc.**, USA  
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081  
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556  
Website: [www.drg-international.com](http://www.drg-international.com)  
E-mail: [corp@drg-international.com](mailto:corp@drg-international.com)

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.  
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.  
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.  
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

**Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos**

1	INTRODUCTION .....	2
2	PRINCIPLE OF THE TEST .....	2
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS .....	3
4	REAGENTS.....	4
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	6
6	ASSAY PROCEDURE.....	7
7	EXPECTED NORMAL VALUES.....	8
8	QUALITY CONTROL.....	8
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	8
10	LIMITATIONS OF USE.....	8
11	LEGAL ASPECTS .....	9

1	EINLEITUNG .....	10
2	TESTPRINZIP .....	10
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	10
4	BESTANDTEILE DES KITS .....	11
5	PROBENVORBEREITUNG.....	13
6	TESTDURCHFÜHRUNG .....	14
7	ERWARTETE WERTE .....	15
8	QUALITÄTS-KONTROLLE.....	15
9	ASSAY CHARACTERISTIKA.....	15
10	GRENZEN DES TESTS .....	15
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN .....	16

1	INTRODUZIONE .....	17
2	PRINCIPIO DEL TEST .....	17
3	PRECAUZIONI.....	17
4	COMPONENTI DEL KIT.....	18
5	CAMPIONI.....	20
6	ATTUAZIONE DEL TEST.....	21
7	VALORI NORMALI .....	22
8	CONTROLLO QUALITÀ.....	22
9	CARATTERISTICHE DEL TEST.....	22
10	LIMITAZIONE DEL TEST.....	22
11	ASPETTI LEGALI .....	23

12	REFERENCES / LITERATURE.....	24
----	------------------------------	----

	SYMBOLS USED .....	25
--	--------------------	----

## 1 INTRODUCTION

### 1.1 Intended Use

The **DRG TGF- $\beta$ 2 ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of TGF- $\beta$ 2 in serum, plasma and cell culture supernatant.

### 1.2 Summary and Explanation

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 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. TGF- $\beta$ 2 is not produced by blood platelets, contrary to TGF- $\beta$ 1. This potent Cytokine modulates embryonic development, bone formation, mammary development, wound healing, hematopoiesis, cell cycle progression and the production of the extracellular matrix. TGF- $\beta$ 2 – null mice were shown to exhibit perinatal mortality and a wide range of developmental defects for a single gene description which include cardiac, lung, craniofacial, limb, spinal column, eye, inner ear and urogenital defects. TGF- $\beta$ 2 has been shown to be a potent growth inhibit factor in the regulation of postnatal cerebellar neurons and neuroblast proliferation. TGF- $\beta$ 2 has been detected in tear fluid. TGF- $\beta$ 2 levels are elevated in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. Elevated plasma levels of TGF- $\beta$ 2 have been described in patients with disseminated malignant melanoma. TGF- $\beta$ 2 concentrations are furthermore elevated in Parkinson's disease in ventricular cerebrospinal fluid.

## 2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DRG TGF- $\beta$ 2 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 Neutralization Buffer.

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 biotinylated mouse anti TGF- $\beta$ 2 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- $\beta$ 2 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 instructions for use 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 - 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 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 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 Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DRG

## 4 REAGENTS

### 4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12x8 (break apart) strips, 96 wells;  
Wells coated with anti-TGF-β2 antibody (polyclonal).
2. **Standard (Stock Standard)**, 1 vial, 2 mL,  
Concentrations: 1000 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“.  
Contain non-mercury preservative.
4. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 11 mL, ready to use,  
Mouse anti TGF antibody conjugated to Biotin.  
Contain non-mercury preservative.
5. **Enzyme Complex**, 1 vial, 11 mL, ready to use  
Streptavidin Peroxidase  
Contain non-mercury preservative.
6. **Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,  
Tetramethylbenzidine (TMB).
7. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,  
contains 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
8. **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated),  
see „Preparation of Reagents“.
9. **1 M HCl**, 1 vial, 2 mL, ready to use,  
for acidification of the samples.
10. **Neutralization Buffer**, 1 vial, 2 mL, ready to use,  
for neutralization.

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

### 4.2 Material 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 ± 10 nm) (e.g. the DRG Instruments Microtiter Plate Reader).
- 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

Allow all reagents and required number of strips to reach 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** (1,000 pg/mL):

<b>Description</b>	<b>Concentration</b>
<b>Standard A</b>	<b>1,000 pg/mL</b>
<b>Standard B</b> 1 mL Standard A + 1 mL Assay Buffer	<b>500 pg/mL</b>
<b>Standard C</b> 1 mL Standard B + 1 mL Assay Buffer	<b>250 pg/mL</b>
<b>Standard D</b> 1 mL Standard C + 1 mL Assay Buffer	<b>125 pg/mL</b>
<b>Standard E</b> 1 mL Standard D + 1 mL Assay Buffer	<b>62.5 pg/mL</b>
<b>Standard F</b> 1 mL Standard E + 1 mL Assay Buffer	<b>31.25 pg/mL</b>
<b>Standard G</b> 2 mL Assay Buffer	<b>0 pg/mL</b>

**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 Sheets (see chapter 13).

#### 4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DRG 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 - 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 µL Serum + 490 µL *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-β2 concentrations, e.g. 1:10, if a high TGF-β2 concentration is expected. The results have to be multiplied with the dilution factor.

##### Example:

dilution 1:10: 10 µL Sample + 90 µL *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 µL Standards** or **pre-diluted 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 µL 1 M HCl** to all caps
3. Close caps, mix thoroughly (vortex) and let stand for 15 minutes
4. For Neutralization add **20 µL 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  $\mu$ L** of each pre-treated **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 3 hours at room temperature.
4. Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells **3 times** with diluted wash solution, 300  $\mu$ 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  $\mu$ l Enzyme Conjugate** into each well.
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  $\mu$ l per Well. Strike the wells sharply on absorbance paper to remove residual droplets.
8. Dispense **100  $\mu$ l Enzyme Complex** into each well.
9. Incubate **20 minutes** at room temperature.
10. Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells **3 times** with diluted wash solution, 300  $\mu$ l per Well. Strike the wells sharply on absorbance paper to remove residual droplets.
11. Add **100  $\mu$ L of Substrate Solution** to each well.
12. Incubate for **10 minutes** at room temperature.
13. Stop the enzymatic reaction by adding **50  $\mu$ L of Stop Solution** to each well.
14. 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. 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 Instructions for Use have been calculated automatically using a 4-Parameter curve fit. (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods.) 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. 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 DRG directly.

## 9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 10 – 1000 pg/mL.

### 9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

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

Component	Cross reactivity
TGF-β1	none
TGF-β3	none

### 9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity was calculated from the mean plus two standard deviations of twenty (20) replicate analyses of *Standard 0* and was found to be 10 pg/mL.

### 9.4 Reproducibility

Data can be obtained on request.

### 9.5 Recovery

Data can be obtained on request.

### 9.6 Linearity

Data can be obtained on request.

## 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-β2 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 DRG.

### **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.

## 1 EINLEITUNG

Der **DRG TGF-β2 ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von TGF-β2 in Serum, Plasma (EDTA- oder Zitratplasma) und Zellkulturüberstand eingesetzt.

**Nur für In-vitro Diagnostik.**

## 2 TESTPRINZIP

Der DRG TGF-β2 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 Neutralisationspuffer neutralisiert

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem polyklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine definierte Antikörper-Bindungsstelle des TGF-β2-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 Biotin-Enzymkonjugat (Maus anti-TGF-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-β2-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, Gebrauchsanweisung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt.
- 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 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enthält. Schwefelsäure 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.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DRG Instruments GmbH erhältlich.

## 4 BESTANDTEILE DES KITS

### 4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12x8 Wells (einzeln brechbar);  
Mit anti-TGF- $\beta$ 2-Antikörper (polyklonal) beschichtet.
2. **Standard (Stockstandard)**, 1 Fläschchen, 2 mL,  
Konzentration: 1000 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. **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 11 mL, gebrauchsfertig;  
Mouse anti-TGF-Antikörper mit Biotin konjugiert.  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **Enzyme Complex** (Enzymkomplex), 1 Fläschchen, 11 mL, gebrauchsfertig;  
Streptavidin-Peroxidase  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
6. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;  
Substratlösung TMB.
7. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;  
enthält 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
8. **Wash Solution** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X** konzentriert;  
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.
9. 1 M **HCl**, 1 Fläschchen, 2 mL, gebrauchsfertig,  
für die Ansäuerung der Proben.
10. **Neutralization Buffer** (Neutralisierungspuffer), 1 Fläschchen, 2 mL, gebrauchsfertig,  
für die Neutralisation.

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

### 4.2 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- 1,5 mL-Reaktionsgefäße (z.B. von Eppendorf) zur Vorbereitung der Proben (Ansäuerung und Neutralisation).
- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450  $\pm$  10 nm Filter), (z.B. das DRG Instruments Mikrotiterplattenlesegerät)
- 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.

Der **unverdünnte Stock-Standard** kann portioniert bei -20 °C eingefroren werden (für mehr als 6 Wochen).

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** (1000 pg/mL):

<b>Beschreibung</b>	<b>Konzentration</b>
<b>Standard A</b>	<b>1,000 pg/mL</b>
<b>Standard B</b> 1 mL Standard A + 1 mL Assay Buffer	<b>500 pg/mL</b>
<b>Standard C</b> 1 mL Standard B + 1 mL Assay Buffer	<b>250 pg/mL</b>
<b>Standard D</b> 1 mL Standard C + 1 mL Assay Buffer	<b>125 pg/mL</b>
<b>Standard E</b> 1 mL Standard D + 1 mL Assay Buffer	<b>62.5 pg/mL</b>
<b>Standard F</b> 1 mL Standard E + 1 mL Assay Buffer	<b>31.25 pg/mL</b>
<b>Standard G</b> 2 mL Assay Buffer	<b>0 pg/mL</b>

***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 Sicherheitsdatenblatt, Kapitel 13.

#### 4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DRG 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 hämolytierte 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 - 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 durchgemischt 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 TGF-β2 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 M 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  $\mu$ 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 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **3mal** mit verdünnter *Wash Solution* (300  $\mu$ 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 Waschschrittes!
5. **100  $\mu$ L Enzyme Conjugate** (Anti-Maus-Biotin) in jedes Well geben.
6. Bei Raumtemperatur für **120 Minuten** inkubieren.
7. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **3mal** mit verdünnter *Wash Solution* (300  $\mu$ L) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
8. **100  $\mu$ L Enzyme Complex** in jedes Well geben.
9. Bei Raumtemperatur für **20 Minuten** inkubieren.
10. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **3mal** mit verdünnter *Wash Solution* (300  $\mu$ L) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
11. **100  $\mu$ L Substrate Solution** in jedes Well geben.
12. Bei Raumtemperatur für **10 Minuten** inkubieren.
13. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50  $\mu$ L Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
14. 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 Gebrauchsanweisung angegebenen Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter-Gleichung bestimmt. (4 Parameter Rodbard oder 4 Parameter Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) 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 zusätzlich 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 ungültig 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 DRG in Verbindung.

## 9 ASSAY CHARACTERISTIKA

### 9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 10 – 1000 pg/mL.

### 9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

### 9.3 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert plus der zweifachen Standardabweichung des *Standards 0* (n = 20), beträgt 10 pg/mL.

Die Daten zu:

### 9.4 Präzision

### 9.5 Wiederfindung

### 9.6 Linearität

sind auf Anfrage verfügbar.

## 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-β2-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 DRG 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.

## 1 INTRODUZIONE

Il test immuno-enzimatico **DRG TGF-β2 ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa di fattore di crescita trasformante β2 (TGF-β2) in siero, plasma (EDTA- or citrate plasma) o colture cellulari.

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

## 2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test kit DRG TGF-β2 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 Neutralization Buffer.

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 anti anti-TGF-β 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-β2 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 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. L'acido solforico 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 magazzinati 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 DRG Instruments GmbH.

## 4 COMPONENTI DEL KIT

### 4.1 Contenuto del kit

1. **Microtiterwells** (Micropozzetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti; Pozzetti ricoperti con l'anti- TGF-β2 anticorpo (policonale)
2. **Standard (Stock Standard)**, 1 flacone, 2 mL, stock conc.,  
Concentrazione: 1000 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. **Enzyme Conjugate** (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 11 mL, pronto all'uso  
anti-TGF coniugato alla biotina.  
Contiene conservante senza mercurio.
5. **Enzyme Complex** (Complesso enzimatico), 1 flacone, 11 mL, pronto all'uso;  
perossidasi di streptavidina;  
Contiene conservante senza mercurio.
6. **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;  
TMB (benzidine tetrametilico).
7. **Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;  
contiene 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
8. **Wash Solution** (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (concentrata 40X);  
vedi „preparazione dei reagenti“.
9. 1 M **HCl**, 1 flacone, 2 mL, pronto all'uso,  
per la acidificazione die campioni.
10. **Neutralization Buffer**, 1 flacone, 2 mL, pronto all'uso,  
per la neutralizzazione die campioni.

**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 die campioni (acidificazione e neutralizzazione).
- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450 ± 10 nm) (p.es. il DRG Instruments Microtiterplate Reader).
- 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** (1000 pg/mL):

<b>Descrizione</b>	<b>concentrazione</b>
<b>Standard A</b>	<b>1,000 pg/mL</b>
<b>Standard B</b> 1 mL Standard A + 1 mL Assay Buffer	<b>500 pg/mL</b>
<b>Standard C</b> 1 mL Standard B + 1 mL Assay Buffer	<b>250 pg/mL</b>
<b>Standard D</b> 1 mL Standard C + 1 mL Assay Buffer	<b>125 pg/mL</b>
<b>Standard E</b> 1 mL Standard D + 1 mL Assay Buffer	<b>62.5 pg/mL</b>
<b>Standard F</b> 1 mL Standard E + 1 mL Assay Buffer	<b>31.25 pg/mL</b>
<b>Standard G</b> 2 mL Assay Buffer	<b>0 pg/mL</b>

**Nota:** Gli standard diluiti sono stabili per 1 settimana a 2 °C - 8 °C. Per periodi più 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 DRG, al più 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 - 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-β2 aspettata nel campione, p.es. 1:10 se una alta concentrazione di TGF-β2 è 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 M 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 **3 ore** 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 Enzyme Conjugate** 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 Complex** in ogni pozzetto.
9. Incubare per **20 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. Aggiungere **100 µL** della *Substrate Solution* ad ogni pozzetto.
12. Incubare per **10 minuti** a temperatura ambiente.
13. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **50 µL** della *Stop Solution* ad ogni pozzetto.
14. 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 valori riportati in queste istruzioni per l'uso sono stati determinati tramite l'equazione a 4 parametri. (I metodi preferiti sono 4 Parameter Rodbard oppure 4 Parameter Marquardt.) Altri funzioni usati per l'elaborazione 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 più elevata dello standard più 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 DRG.

## 9 CARATTERISTICHE DEL TEST

### 9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 10 – 1000 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 più due deviazioni standard di venti (20) repliche dello *Standard 0* ed erano 10 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- $\beta$ 2 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 DRG.

### **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 REFERENCES / LITERATURE**

1. Lawrence Da. Transforming growth factor-beta: An overview. *Kidney Int* 1995;47:S19-S23.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.

## SYMBOLS USED

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