

Product information

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



User's Manual

PLGF (Placenta growth factor) ELISA

Enzyme immunoassay for the quantitative measurement of human placenta growth factor (PLGF) in serum



DE4529



96 wells

***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

1	INTRODUCTION	3
2	PRINCIPLE OF THE TEST	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	4
4	REAGENTS.....	5
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	6
6	ASSAY PROCEDURE	6
7	EXPECTED NORMAL VALUES	8
8	QUALITY CONTROL	9
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	9
10	LIMITATIONS OF USE	11
11	LEGAL ASPECTS	11
1	EINLEITUNG	12
2	TESTPRINZIP	12
3	VORSICHTSMAßNAHMEN	12
4	BESTANDTEILE DES KITS	13
5	PROBENVORBEREITUNG	14
6	TESTDURCHFÜHRUNG	14
7	ERWARTETE WERTE.....	16
8	QUALITÄTS-KONTROLLE	17
9	ASSAY CHARACTERISTIKA.....	17
10	GRENZEN DES TESTS.....	18
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	18
12	REFERENCES / LITERATURE	19
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	20

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **Demeditec PLGF ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of human placenta growth factor (PLGF) in serum. It can be used as a diagnostic aid to estimate the probability of preeclampsia for pregnant women. Details can be found in chapter 7 "Expected normal values"

1.2 Summary and Explanation

Angiogenesis and vascular transformation are important processes in the normal development of the placenta. Abnormal angiogenesis and vascular transformation are considered to be one of the main reasons for preeclamptic pregnancies and intrauterine growth retardation. Placental growth factor PLGF, a member of the VEGF family, is produced mainly by the placenta and is a potent angiogenic factor. The corresponding receptor, the soluble fms-like tyrosine kinase-1 is considered to have angiogenic properties.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The Demeditec PLGF ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the sandwich principle. The microtiter wells are coated with a monoclonal antibody directed towards a unique antigenic site of the PLGF molecule. An aliquot of patient sample containing endogenous PLGF is incubated in the coated well. After a washing step a biotin-linked polyclonal antibody specific for PLGF is added to the wells. Following a wash to remove any unbound antibody a streptavidin HRP enzyme complex is added to the wells. After incubation the unbound enzyme complex is washed off. The amount of bound peroxidase is proportional to the concentration of PLGF in the sample. Having added the substrate solution, the intensity of colour developed is proportional to the concentration of PLGF in the patient sample.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

- This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
- 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.
- 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.
- 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.
- Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
- 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.
- Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
- Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
- Allow the reagents to reach room temperature (21 °C to 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.
- Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
- Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
- 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.
- Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
- Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
- 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.
- Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
- 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 Demeditec.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **SORB MT Microtiterwells**, 12x8 (break apart) strips, 96 wells; Wells coated with anti-PLGF antibody (monoclonal).
1. **CAL 0 Zero Standard**, 1 vial, 1 mL, ready to use; Concentration: 0 pg/mL; Contains non-mercury preservative.
2. **CAL 1 – 5 Standard (Standard 1-5)**, 5 vials, 1 mL, ready to use; Concentrations: 25; 50; 125; 500; 1000 pg/mL; Contain non-mercury preservative.
3. **CONTROL low & high Control Low & High**, 2 vials, 1 mL each, ready to use; For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet. Contain non-mercury preservative.
4. **BUF Assay Buffer**, 1 vial, 30 mL, ready to use, Contains non-mercury preservative.
5. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate**, 1 vial, 14 mL, ready to use, biotinylated goat-anti-human PLGF Antibody; Contains non-mercury preservative.
6. **ENZ COMP Enzyme Complex**, 1 vial, 14 mL, ready to use, contains Streptavidin horseradish Peroxidase; Contains non-mercury preservative.
7. **SUB TMB Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use, Tetramethylbenzidine (TMB).
8. **STOP SOLN Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use, contains 0.5 M H₂SO₄, Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
9. **WASH SOLN 40x Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated), see „Preparation of Reagents“.

Note: Additional Zero Standard 0 for sample dilution is available upon request.

4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 ± 10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Distilled or deionized water
- Timer
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

When stored at 2-8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2-8 °C. Microtiter wells must be stored at 2-8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

4.4 Reagent Preparation

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

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 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 should 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.

5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 24 hours at 2-8 °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

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

Example:

- a) dilution 1:10: 10 µL Serum + 90 µL *Assay Buffer* (mix thoroughly)
b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Assay Buffer* (mix thoroughly).

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. All standards, samples, and controls should be run in duplicate. All standards, samples, and controls should be run concurrently so that all conditions of testing are the same.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the holder.
2. Dispense **25 µL** of each **Standard, Controls** and **sample** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **250 µl** of **Assay Buffer** into appropriate wells.
4. Incubate for **30 minutes** at room temperature (without covering the plate).
5. Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells **3 times** with diluted Wash Solution (400 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent 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!

6. Dispense **100 µL Enzyme Conjugate** into each well.
7. Incubate for **60 minutes** at room temperature (without covering the plate).
8. Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells **3 times** with diluted Wash Solution (400 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
9. Add **100 µL of Enzyme Complex** to each well.
10. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
11. Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells 3 times with diluted Wash Solution (400 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
12. Add **100 µL of Substrate Solution** to each well.
13. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
14. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL of Stop Solution** to each well
15. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 ± 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 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. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as > 1000 pg/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Standard	Optical Units (450 nm)
Zero Standard (0 pg/mL)	0.06
Standard 1 (25 pg/mL)	0.18
Standard 2 (50 pg/mL)	0.28
Standard 3 (125 pg/mL)	0.59
Standard 4 (500 pg/mL)	1.63
Standard 5 (1000 pg/mL)	2.35

7 EXPECTED NORMAL VALUES

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

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the Demeditec PLGF ELISA the following values are observed (5% - 95% Percentiles):

Population	number	PLGF (pg/mL)
Adult Females, non-pregnant	65	20.3 – 85.9
Men	99	16.7 – 63.1

The PLGF concentrations in normal pregnancies showed a steady increase with a peak at 28 to 32 weeks, and a consistent decline thereafter (5% - 95% Percentiles).

In pregnancies with gestosis medians and normal values are significantly decreased:

Population	number	Median PLGF (pg/mL)	5% - 95% Percentile PLGF (pg/mL)
Healthy pregnant women (pregnancy weeks 7 - 39)	59	207	33 - 918
Healthy pregnant women (pregnancy weeks 27 - 32) (* these values are also included in the calculation for weeks 7 - 39)	17*	537.95	161 - 950
Pregnant women with Gestosis (pregnancy weeks 12 - 38)	34	33.08	12 - 139
Pregnant women with Gestosis (pregnancy weeks 27 - 32) (** these values are also included in the calculation for weeks 12 - 38)	13**	77.14	13.97 - 268

In order to estimate the probability of preeclampsia, it is recommend to determine PLGF in the 15th - 18th or 20th - 22nd week of pregnancy.

**If the PLGF concentration in serum in the 15th – 18th week of pregnancy is < 42 pg/mL
20th – 22nd week of pregnancy is < 100 pg/mL**

there is an elevated probability of development of preeclampsia during this pregnancy.

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

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.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy 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 1.06 – 1000 pg/mL.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

Less than 20% cross-reactivity with rhVEGF/PLGF and less than 0.07% cross-reactivity with rhFLT, rmPLGF-2, rhPDGF and rhVEGF was observed.

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 Zero Standard and was found to be < 1.062 pg/mL.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra Assay

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	10	50.5	2.8
2	10	478.6	1.7

9.4.2 Inter Assay

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	6	45.8	4.10
2	10	421.4	7.0

9.5 Recovery

Sera have been spiked by adding PLGF solutions with known concentrations in a 1:1 ratio. The % Recovery has been calculated by multiplication of the ratio of the measurements and the expected values with 100.

Sample	Endogenous PLGF (pg/mL)	Added PLGF (pg/mL)	Measured Conc. PLGF (pg/mL)	Expected Conc. PLGF (pg/mL)	Recovery (%)
1	21.28	0	21.28		
		500	509.59	510.64	99.8
		250	226.72	260.64	87.0
		63	63.98	73.14	87.5
		25	32.17	35.64	90.3
2	41.97	0	41.97		
		500	516.37	520.99	99.1
		250	283.89	270.99	104.8
		63	78.01	83.49	93.4
		25	40.63	45.99	88.4
3	444.18	0	444.18		
		500	682.31	722.09	94.5
		250	458.57	472.09	97.1
		63	279.63	284.59	98.3
		25	260.68	247.09	105.5

9.6 Linearity

Sera were diluted with Zero Standard.

Sample	Dilution	Measured Conc. PLGF (pg/mL)	Expected Conc. PLGF (pg/mL)	Recovery (%)
P2	undiluted	28.47	28.47	
	1 : 2	15.35	14.24	107.8
	1 : 4	7.82	7.12	109.9
	1 : 8	3.90	3.56	109.7
	1:16	2.00	1.78	112.6
P4	undiluted	49.73	49.73	
	1 : 2	21.89	24.86	88.1
	1 : 4	13.32	12.43	107.2
	1 : 8	6.95	6.22	111.9
	1:16	3.47	3.11	111.6
P5	undiluted	479.10	479.10	
	1 : 2	259.93	239.55	108.5
	1 : 4	122.22	119.77	102.0
	1 : 8	64.49	59.89	107.7
	1:16	32.89	29.94	109.8

9.7 Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. In the 15th – 18th week of pregnancy it is 0.83.

9.8 Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. In the 15th – 18th week of pregnancy it is 0.87.

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

Haemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.5 mg/mL) have no influence on the assay results. Triglycerides of 1.9 mg/mL and higher may influence the test result.

10.2 Drug Interferences

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

10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test up to 250000 pg/mL (250 ng/mL)

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.

1 EINLEITUNG

Der **Demeditec PLGF ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von PLGF (human placenta growth factor) in humanem Serum eingesetzt.

Nur für In-vitro Diagnostik.

2 TESTPRINZIP

Der Demeditec PLGF ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der Sandwichtechnik basiert.

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine definierte Antikörper-Bindungsstelle des PLGF-Moleküls gerichtet ist. Die Proben mit endogenem PLGF inkubieren in den beschichteten Wells. Nach einem Waschschrift wird Enzymkonjugat zugegeben. Das Konjugat enthält einen polyklonalen anti-PLGF-Antikörper, der mit Biotin konjugiert ist. Nach einem weiteren Waschschrift wird ein Streptavidin-HRP-Enzymkomplex hinzugefügt. Ungebundener Enzymkomplex 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 PLGF-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 Material 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 H₂SO₄ 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.
- Material Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **SORB MT Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar); Mit anti-PLFG-Antikörper (monoklonal) beschichtet.
2. **CAL 0 Zero Standard**, (Nullstandard) 1 Fläschchen, 1 mL, gebrauchsfertig; Konzentration: 0 pg/mL; Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **CAL 1 – 5 Standard (Standard 1-5)**, 5 Fläschchen, je 1 mL, gebrauchsfertig; Konzentrationen: 25; 50; 125; 500; 1000 pg/mL. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **CONTROL low & high Control** (Kontrolle), 2 Fläschchen (gebrauchsfertig), je 1 mL; Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **BUF Assay Buffer** (Assaypuffer), 1 Fläschchen, 30 mL, gebrauchsfertig; Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
6. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Anti-human PLFG-Antikörper (Ziege) mit Biotin konjugiert. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
7. **ENZ COMP Enzyme Complex** (Enzymkomplex), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; enthält Streptavidin-Meerrettichperoxidase. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
8. **SUB TMB Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Substratlösung TMB.
9. **STOP SOLN Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; enthält 0,5M H₂SO₄. Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
10. **WASH SOLN 40x Wash Solution** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X** konzentriert; Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

Anmerkung: Zusätzlicher Zero Standard zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 ± 10 nm Filter)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2-8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2-8 °C gelagert werden. Die Mikrotiterwells sollten bei 2-8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

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

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 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

Für diesen Test muss Serum 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.: Sarstedt Monovette – mit entsprechender Plasma-Präparierung), 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.

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 24 Stunden bei 2-8 °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

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 Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel:

- a) Verdünnung 1:10: 10 µL Serum + 90 µL *Assay Buffer* gründlich mischen)
- b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL *Assay Buffer* (gründlich mischen).

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.

Alle Standards, Proben und Kontrollen sollten gleichzeitig in Doppelbestimmung durchgeführt werden, so dass alle Testbedingungen gleich sind.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 25 µL Standards, Control und Proben mit neuen Plastikspitzen** in die entsprechenden Wells geben.
3. **Je 250 µl Assay Buffer** in jedes Well geben.
4. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren (ohne die Platte abzudecken).
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **3-mal** mit verdünnter Waschlösung (400 µL pro Well) 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!
6. **100 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben.
7. **60 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren (ohne die Platte abzudecken).
8. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **3-mal** mit verdünnter Waschlösung (400 µL pro Well) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
9. **100 µL Enzyme Complex** in jedes Well geben.
10. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren
11. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **3-mal** mit verdünnter Waschlösung (400 µL pro Well) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
12. **100 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
13. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
14. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
15. Die Optische Dichte bei **450 ±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. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem Demeditec ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Zero Standard (0 pg/mL)	0,06
Standard 1 (25 pg/mL)	0,18
Standard 2 (50 pg/mL)	0,28
Standard 3 (125 pg/mL)	0,59
Standard 4 (500 pg/mL)	1,63
Standard 5 (1000 pg/mL)	2,35

7 ERWARTETE WERTE

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

In einer Studie wurden die Proben von anscheinend gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem Demeditec PLGF ELISA folgende Werte (5% - 95% Perzentile):

Population	N	PLGF (pg/mL)
Erwachsene Frauen, nicht schwanger	65	20,3 - 85,9
Männer	99	16,7 - 63,1

In einer normalen Schwangerschaft zeigt die PLGF-Konzentration einen stetigen Anstieg, mit einem Peak in der 28. bis 32. Woche. Nach dieser Zeit fällt die Konzentration ab (5% - 95% Perzentile). Bei Schwangerschaften mit Gestose sind Mediane und Normwerte deutlich erniedrigt.

Population	N	Median PLGF (pg/mL)	5% - 95% Perzentile PLGF (pg/mL)
Gesunde, schwangere Frauen (Schwangerschaftswoche 7 - 39)	59	207	33 - 918
Gesunde, schwangere Frauen (Schwangerschaftswoche 27 - 32) (* Diese Werte sind auch in der Berechnung der Werte für SSW 7 - 39 enthalten.)	17*	537,95	161 - 950
Schwangere Frauen mit Gestose (Schwangerschaftswoche 12 - 38)	34	33,08	12 - 139
Schwangere Frauen mit Gestose (Schwangerschaftswoche 27 - 32) (** Diese Werte sind auch in der Berechnung der Werte für SSW 12 - 38 enthalten.)	13**	77,14	13,97 - 268

Um die Wahrscheinlichkeit einer Präeklampsie zu ermitteln, sollte PLGF in der 15. - 18. SSW, bzw. 20.-22. SSW (Schwangerschaftswoche) bestimmt werden.

**Liegt die PLGF-Konzentration im Serum in der
15. - 18. SSW < 42 pg/mL**

20. - 22. SSW < 100 pg/mL

ist von einer erhöhten Wahrscheinlichkeit auszugehen, dass sich im Verlauf der Schwangerschaft eine Präeklampsie entwickelt.

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 wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern. 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 Demeditec in Verbindung.

9 ASSAY CHARACTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 1,06 – 1000 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 Nullstandards (n = 20), beträgt < 1.062 pg/mL

Die Daten zu:

9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

9.7 Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. In der 15. – 18. SSW beträgt sie 0,83.

9.8 Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. In der 15. – 18. SSW beträgt sie 0,87.

10 GRENZEN DES TESTS

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

10.1 Interferenzen

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL) und Bilirubin (bis zu 0.5 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis. Triglyceride ab einer Konzentration von 1,9 mg/mL können das Testergebnis beeinflussen.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

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

10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook Effekt tritt bei Proben mit bis zu 250000 pg/mL (250 ng/mL) PLGF nicht auf.

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 REFERENCES / LITERATURE

1. Levine RJ, Thadhani R, Qian C, Lam C, Lim KH, Yu KF, Blink AL, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA.
Urinary placental growth factor and risk of preeclampsia.
JAMA. 2005 Jan 5;293(1):77-85.
2. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA.
Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia.
N Engl J Med. 2004 Feb 12;350(7):672-83. Epub 2004 Feb 5.
3. Schmidt M., Dogan C., Birdir C., Callies R., Kuhn U., Gellhaus A., Janetzko A., Kimmig R. and Kasimir-Bauer S.
Altered angiogenesis in preeclampsia: evaluation of a new test system for measuring placental growth factor
Clin Chem Lab Med 2007;45(11):1504-1510

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	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	Ussage Diagnostic in vitro	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
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature 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