

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



## User's Manual

# HCG ELISA

IVD



REF

**DE1469**



**96 Wells**

**Contents / Inhaltsverzeichnis / Contenuti / Contenido / Contenu**

1	INTRODUCTION .....	3	1	INTRODUCCIÓN.....	26
2	PRINCIPLE OF THE TEST .....	3	2	FUNDAMENTO DEL ENSAYO .....	26
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	4	3	PRECAUCIONES .....	26
4	REAGENTS.....	5	4	COMPONENTES DEL KIT .....	27
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION ...	6	5	MUESTRAS.....	28
6	ASSAY PROCEDURE.....	6	6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO .....	28
7	EXPECTED NORMAL VALUES .....	8	7	VALORES ESPERADOS .....	30
8	QUALITY CONTROL.....	9	8	CONTROL DE CALIDAD.....	31
9	ASSAY CHARACTERISTICS.....	9	9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO .....	31
10	LIMITATIONS OF USE.....	11	10	LIMITACIONES DE USO.....	32
11	LEGAL ASPECTS .....	11	11	ASPECTOS LEGALES.....	32
12	REFERENCES .....	11	12	REFERENCIAS .....	32

1	EINLEITUNG .....	12	1	INTRODUCTION .....	33
2	TESTPRINZIP .....	12	2	PRINCIPE DU TEST .....	33
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	12	3	PRECAUTIONS D'UTILISATION .....	33
4	BESTANDTEILE DES KITS .....	13	4	COMPOSITION DU KIT .....	34
5	PROBENVORBEREITUNG.....	14	5	ECHANTILLON .....	35
6	TESTDURCHFÜHRUNG.....	14	6	RÉALISATION DU TEST.....	35
7	ERWARTETE WERTE .....	16	7	VALEURS ATTENDUES .....	37
8	QUALITÄTS-KONTROLLE.....	17	8	CONTROLE DE QUALITE .....	38
9	ASSAY CHARACTERISTIKA .....	17	9	CARACTERISTIQUES DU TEST.....	38
10	GRENZEN DES TESTS .....	17	10	LIMITES D'UTILISATION .....	39
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN.....	18	11	ASPECTS LEGAUX .....	39
12	REFERENZEN .....	18	12	REFERENCES .....	39

1	INTRODUZIONE .....	19	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISA'S .....		40
2	PRINCIPIO DEL TEST .....	19			
3	PRECAUZIONI .....	19			
4	COMPONENTI DEL KIT.....	20			
5	CAMPIONI.....	21			
6	ATTUAZIONE DEL TEST.....	21			
7	VALORI NORMALI .....	23			
8	CONTROLLO QUALITÀ.....	24			
9	CARATTERISTICHE DEL TEST .....	24			
10	LIMITAZIONE DEL TEST .....	24			
11	ASPETTI LEGALI .....	25			
12	BIBLIOGRAFIA.....	25			

## 1 INTRODUCTION

### 1.1 Intended Use

The **DEMEDIATEC HCG ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of intact human chorionic gonadotropin (hCG) in serum or plasma.

### 1.2 Summary and Explanation

Chorionic Gonadotropin (hCG) is a glycoprotein hormone which is normally produced by the placenta during pregnancy. After conception, the hCG concentration increases rapidly to reach a peak near the end of the first trimester. High concentrations are observed throughout pregnancy. After delivery, hCG levels fall rapidly and become undetectable after a few days.

Structurally intact hCG molecules are composed of an alpha and a beta subunit with a molecular weight of 38.4 kDa. The alpha subunit is nearly identical to the alpha subunits of other glycoprotein hormones, such as Thyroid Stimulating Hormone (TSH), Luteinizing Hormone (LH), and Follicle Stimulating Hormone (FSH): The differences in the beta subunit of the respective hormones account for their biological specificity and immunochemical distinctiveness.

Monoclonal antibodies recognizing unique sites on the beta chain of the hCG molecule are essential for differentiation between hCG and LH, FSH and TSH.

HCG Assays are used for the early detection of pregnancy.

1. In addition to the elevated hCG levels during pregnancy, high concentrations of hCG may be associated with neoplasms of trophoblastic and nontrophoblastic origin such as hydatiform mole, chorionepithelioma, embryonal cell carcinoma, and many others.
2. HCG is commonly elevated in different testicular tumors and is thus used as a tumormarker for testicular tumors in combination with AFP. There is a good correlation between changes in hCG levels and response to therapy.
3. Extragonadal germ-cell cancers in the absence of clinically or ultrasonographically detectable testicular abnormalities have been observed as well. Over 50% of patients with malignant insulinomas have elevated hCG levels: the hormone is not detected in association with benign adenomas. Ectopic secretion of hCG also have been found in a small percentage of patients with adenocarcinoma of the ovary, pancreas and stomach, hepatomas, and islet-cell carcinomas.

## 2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DEMEDIATEC HCG ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the sandwich principle.

The microtiter wells are coated with a monoclonal [mouse] antibody directed towards a unique antigenic site on a hCG molecule. An aliquot of patient sample containing endogenous hCG is incubated in the coated well with enzyme conjugate, which is a monoclonal antibody directed against the alpha-chain of hCG conjugated with horseradish peroxidase. After incubation the unbound conjugate is washed off. The amount of bound peroxidase is proportional to the concentration of hCG in the sample. Having added the substrate solution, the intensity of colour developed is proportional to the concentration of hCG in the patient sample.

### 3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (21 °C 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.
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 Material Safety Data Sheets. Material Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DEMEDITEC.

## 4 REAGENTS

### 4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12x8 (break apart) strips, 96 wells;  
Wells coated with anti- $\beta$ -HCG antibody (monoclonal).
  2. **Standard (Standard 1-5)**, 5 vials (lyophilized), 1.0 mL;  
Concentrations: 5; 50; 200; 500; 1000 mIU/mL  
Conversion: 1 pg/mL = 0,00916 mIU/mL  
*The concentrations of the DEMEDITEC HCG Kit standards match the international Reference material Chorionic Gonadotropin, Reference reagent 2001 (NIBSC Code number 99/688).*  
See „Preparation of Reagents“;  
\* contain 0.03% Proclin 300, 0.015% BND and 0.010% MIT as preservatives.
  3. **Sample Diluent**, 1 vial, 10 mL, ready to use,  
0 mIU/mL  
\* contain 0.03% Proclin 300, 0.015% BND and 0.010% MIT as preservatives.
  4. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 11 mL, ready to use,  
Monoclonal antibody against the alpha-subunit conjugated to horseradish peroxidase;  
\* contain 0.03% Proclin 300, 0.015% BND and 0.010% MIT as preservatives.
  5. **Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,  
Tetramethylbenzidine (TMB).
  6. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,  
contains 1 N acidic solution. Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
- \* BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane  
MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

**Note:** Additional *Sample Diluent* for sample dilution is available upon request.

### 4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 $\pm$ 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 °C - 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2 °C - 8 °C. 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.

### 4.4 Reagent Preparation

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

#### **Standards**

Reconstitute the lyophilized contents of the standard vial with 1.0 mL Aqua dest.

**Note:** *The reconstituted standards are stable for 2 months at 2 °C - 8 °C. For longer storage freeze at -20 °C.*

### 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.

### 4.6 Damaged Test Kits

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

## 5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or plasma (EDTA-, Heparin- or citrat plasma) 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 # 02.1388.001), 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 and centrifuged immediately after collection.

(E.g. for EDTA plasma Sarstedt Monovette – red cap - # 02.166.001;  
for Heparin plasma Sarstedt Monovette – orange cap - # 02.165.001;  
for Citrate plasma Sarstedt Monovette – green cap - # 02.167.001.)

### 5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 5 days 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

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Sample Diluent* 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 *Sample Diluent* (mix thoroughly)  
b) dilution 1:100:         10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Sample Diluent* (mix thoroughly).

**NOTE:** Sera of pregnant women must be diluted 1/100 in *Sample Diluent* before starting the assay.

## 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 (Quantitative Method)

Each run must include a standard curve.

**NOTE:** Sera of pregnant women must be diluted 1/100 in *Sample Diluent* before starting the assay. (s. 5.3.)

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the holder.
2. Dispense **25 µL** of each *Standard*, *Control* and samples with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **100 µL Enzyme Conjugate** into each well.  
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
5. Briskly shake out the contents of the wells.  
Rinse the wells 5 times with distilled water (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. Add **100 µL** of *Substrate Solution* to each well.
7. Incubate for **10 minutes** at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **50 µL** of *Stop Solution* to each well.
9. 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 Test Procedure (Qualitative Method)

This procedure differentiates positive (pregnant) from negative samples by comparing the sample hCG levels with *Sample Diluent* (0 mIU/mL) and *Standard 2* (50 mIU/mL).

Patient samples are run in parallel with the *Sample Diluent* (0 mIU/mL) and the 50 mIU/mL *Standard 2*. The assay procedure is identical with the Quantitative Method, but step 9 and 10 is omitted.

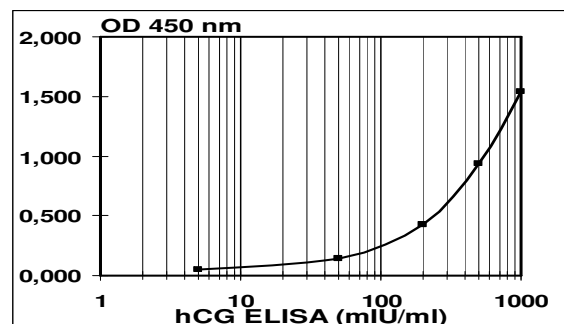
## 6.4 Calculation of Results (Quantitative)

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using semi-logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as > 1000 mIU/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

### 6.4.1 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)
Standard 1 (5 mIU/mL)	0.05
Standard 2 (50 mIU/mL)	0.14
Standard 3 (200 mIU/mL)	0.43
Standard 4 (500 mIU/mL)	0.94
Standard 5 (1000 mIU/mL)	1.54



## 6.5 Qualitative Results

For a qualitative analysis of the hCG level the color development of the specimen is compared with the color of the *Sample Diluent* (0 mIU/mL) and *Standard 2* (50 mIU/mL).

If the blue color is less intense than the color of the 50 mIU/mL *Standard*, the sample is considered as negative.

If the blue color is more intense than or equal to the color of the 50 mIU/mL *Standard* the sample is considered as positive.

## 7 EXPECTED NORMAL VALUES

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

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.

### 7.1 Normal healthy adults, non-pregnant

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the DEMEDITEC HCG ELISA the following values are observed:

Population	Age (years)	Valid N	hCG [mIU/mL]
men	< 50	40	< 5
	> 50	10	< 5
women	< 50	42	< 5
	> 50	7	< 5

### 7.2 Normal serum hCG levels during pregnancy

pregnancy week	Concentration mIU/mL	pregnancy week	Concentration mIU/mL
2.-3.	10 - 50	13.	12500 - 95000
4.	40 - 1000	14.	10500 - 80000
5.	400 - 20700	15.	9000 - 70000
6.	2200 - 74200	16.	7000 - 64000
7.	6000 - 130000	17.	5500 - 56000
8.	2900 - 190000	18.	4500 - 50000
9.	18500 - 205000	19.	3300 - 40000
10.	18000 - 200000	20.	2500 - 32000
11.	16500 - 180000	21.	1800 - 25000
12.	14500 - 125000		

During the first six weeks of pregnancy, serum hCG concentrations have a doubling time of approximately two days. After delivery, hCG levels fall rapidly and disappear completely after a few days. Very low levels of hCG can be present in ectopic pregnancies (see Braunstein, G. a.o., First-trimester chorionic gonadotropin measurements as an aid in the diagnosis of early pregnancy disorders. In: American Journal of Obstetrics and Gynaecology, V. 131, No. 1., pp. 25-32. May 1978, St. Louis), while conditions like choriocarcinoma, trophoblastic or nontrophoblastic neoplasms or hydatiform moles may result in very high hCG concentrations.

### CAUTION :

- For the detection of pregnancy in serum, a qualitative assay is used with a cut-off point of 50 mIU/mL. Negative or borderline results should be repeated on a fresh specimen obtained at least 48 hours after the first specimen.
- It has been shown that immunological pregnancy tests may yield false results in cases of several diseases (such as rheumatoid arthritis or myelomas). In such cases, the interpretation of the pregnancy test should be done carefully.



## 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 5 – 1000 mIU/mL.

### 9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

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

Protein	Concentration	Produced Colour Intensity Equivalent to HCG in serum (mIU/ml)
hLH	300 mIU/mL	9
hLH	200 mIU/mL	< 5
hLH	80 mIU/mL	< 5
TSH	75 µIU/mL	10
TSH	50 µIU/mL	6
TSH	25 µIU/mL	< 5
FSH	200 mIU/mL	< 5
FSH	50 mIU/mL	< 5

### 9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity was calculated by adding 2 standard deviations to the mean of 20 replicate analyses of *Sample Diluent* and was found to be < 5 mIU/mL.

### 9.4 Reproducibility

#### 9.4.1 Intra Assay

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (mIU/mL)	CV (%)
1	20	250.4	4.7
2	20	176.9	2.2
3	20	86.6	3.5

### 9.4.2 Inter Assay

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (mIU/mL)	CV (%)
1	20	246	4.3
2	20	174	4.0
3	20	87	3.3

### 9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding hCG solutions with known concentrations in a 1:1 ratio.

The expected values were calculated by addition of half of the values determined for the undiluted samples and half of the values of the known solutions. The % Recovery has been calculated by multiplication of the ratio of the measurements and the expected values with 100.

Sample	Added Conc. 1:1 (v/v) (mIU/mL)	Measured Conc. (mIU/mL)	Expected Conc. (mIU/mL)	Recovery (%)
1	-	14.1	14.1	100
	50	35.6	32.05	111
	30	21	22.05	95
	25	19	19.55	97
2	-	268	268	100
	50	149	159	94
	200	231	234	99
	500	408	384	106
3	-	79	79	100
	50	61	64.5	95
	100	83	89.5	93
	200	139	139.5	100

### 9.6 Linearity

Sample	Dilution	Mean Conc. (mIU/mL)	Recovery (%)
1	None	634	-
	1:2	278	88
	1:4	136.2	86
	1:8	71.4	90
	1:16	38.1	96
2	None	613	-
	1:2	276	90
	1:4	131.2	86
	1:8	71.6	93
	1:16	38.1	99
3	None	242	-
	1:2	123	102
	1:4	57	94
	1:8	31	102
	1:16	16.1	106

## 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) and Triglyceride (up to 30 mg/mL) have no influence on the assay results.

### 10.2 Drug Interferences

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

### 10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test up to 13,300 mIU/mL of hCG.

## 11 LEGAL ASPECTS

### 11.1 Reliability of Results

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

### 11.2 Therapeutic Consequences

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

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

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

### 11.3 Liability

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

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

## 12 REFERENCES

1. Thomas Labor und Diagnose. 5. Auflage, Mann K.Hörmann R. und pp 996, ff
2. Mann K, Saller B, Hoermann R. Related Articles, Clinical use of HCG and hCG beta determinations. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 1993; 216:97-104.
3. Braunstein GD, Vaitukaitis JL, Carbone PP and Ross GT. Ectopic production of human chorionic gonadotropin by neoplasms. Ann Intern. Med. 1973, 78: 39-45.
4. Cacciatore B, Tiitinen A, Stenman UH, Ylostalo P. Related Articles, Normal early pregnancy: serum hCG levels and vaginal ultrasonography findings. Br J Obstet Gynaecol. 1990 Oct; 97(10):899-903.

## 1 EINLEITUNG

Der **DEMEDITEC HCG ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von humanem Chorionadotropin (hCG) in Serum und Plasma eingesetzt.

**Nur für In-vitro Diagnostik.**

## 2 TESTPRINZIP

Der DEMEDITEC HCG 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 hCG-Moleküls gerichtet ist.

Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und mit einem Enzymkonjugat inkubiert. Das Konjugat enthält monoklonale, gegen die Alpha-Kette des HCG-Moleküls gerichtete Antikörper, die mit Meerrettichperoxidase konjugiert sind. Es wird ein Sandwichkomplex gebildet.

Das nicht gebundene 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 hCG-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.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Materialsicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 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.
- Materialsicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich. Die Materialsicherheitsdatenblätter entsprechen den Verordnungen der EU-Richtlinie 91/155 EC.

## 4 BESTANDTEILE DES KITS

### 4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12x8 Wells (einzeln brechbar);  
Mit anti- hCG -Antikörper (monoklonal) beschichtet.
  2. **Standard (Standard 1-5)**, 5 Fläschchen (lyophilisiert), je 1,0 mL;  
Konzentrationen: 5; 50; 200; 500; 1000 mIU/mL  
Umrechnungsfaktor: 1 pg/mL = 0,00916 mIU/mL  
*Die DEMEDITEC HCG Standards entsprechen dem 1. WHO Referenzreagenz 2001(NIBSC Code-Nr. 99/688)*  
siehe „Vorbereitung der Reagenzien“  
\* Enthält 0,03% Proclin 300, 0.015% BND und 0.010% MIT als Konservierungsmittel.
  3. **Sample Diluent** (Probenverdünnungsmedium), 1 Fläschchen, 10 mL, gebrauchsfertig;  
0 mIU/mL  
\* Enthält 0,03% Proclin 300, 0.015% BND und 0.010% MIT als Konservierungsmittel.
  4. **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 11 mL, gebrauchsfertig;  
monoklonaler Antikörper gegen die Alpha-Kette, mit Meerrettichperoxidase konjugiert.  
\* Enthält 0,03% Proclin 300, 0.015% BND und 0.010% MIT als Konservierungsmittel.
  5. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;  
Substratlösung TMB.
  6. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;  
enthält 1 N Säure.  
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- \* BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane  
MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

**Anmerkung:** Zusätzliches *Sample Diluent* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

### 4.2 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche 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 °C - 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum.  
Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.  
Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C - 8 °C gelagert werden.  
Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C - 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.

#### **Standards**

Rekonstituieren Sie den lyophilisierten Inhalt der Standardfläschchen mit 1,0 mL destilliertem Wasser.  
**Achtung:** Bei 2 °C - 8 °C sind die rekonstituierten Standards 2 Monate haltbar. Für eine längere Aufbewahrung bei -20 °C einfrieren.

### 4.5 Entsorgung des Kits

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

#### 4.6 Beschädigte Testkits

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

### 5 PROBENVORBEREITUNG

Serum oder Plasma (EDTA-, Heparin- oder Zitratplasma) kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

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

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

#### 5.1 Probenentnahme

##### Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette # 02.1388.001), 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 Antikoagulans enthalten. Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

(z.B. für EDTA-Plasma Sarstedt Monovette – roter Deckel - # 02.166.001;  
für Heparinplasma Sarstedt Monovette – oranger Deckel - # 02.165.001;  
für Zitratplasma Sarstedt Monovette – grüner Deckel - # 02.167.001.)

#### 5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 5 Tage 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 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 *Sample Diluent* 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 *Sample Diluent* gründlich mischen)
- b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL *Sample Diluent* (gründlich mischen).

**Achtung:** Seren von Schwangeren müssen vor Testbeginn 1:100 mit *Sample Diluent* verdünnt werden.

### 6 TESTDURCHFÜHRUNG

#### 6.1 Allgemeine Hinweise

Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut gemischt 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 (Quantitative Methode)

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

**Achtung:** Seren von Schwangeren müssen vor Testbeginn 1:100 mit *Sample Diluent* verdünnt werden. (Siehe Kapitel 5.3.)

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. **100 µL Enzyme-Conjugate** in jedes Well geben.  
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
4. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 5mal mit destilliertem Wasser waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.  
**Achtung:** Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
6. **100 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
7. **10 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
9. Die Optische Dichte bei **450±10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der *Stop Solution* bestimmen.

## 6.3 Testdurchführung (Qualitative Methode)

Dieses Verfahren ermöglicht die Unterscheidung zwischen positiven (Schwangerschaftsnachweis) und negativen Proben durch Vergleich der Patientenproben mit *Sample Diluent* (0 mIU/mL) und dem *Standard 2* mit 50 mIU/mL).

Testdurchführung wie unter "Quantitative Methode" beschrieben. Die Schritte 9 und 10 entfallen.

## 6.4 Ergebnisermittlung (quantitativ)

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

### 6.4.1 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 (450nm)
Standard 1 (5 mIU/mL)	0,05
Standard 2 (50 mIU/mL)	0,14
Standard 3 (200 mIU/mL)	0,43
Standard 4 (500 mIU/mL)	0,94
Standard 5 (1000 mIU/mL)	1,54

## 6.5 Qualitative Ergebnisse

Für die qualitative Auswertung wird die Farbintensität der Probe mit der Farbintensität des *Sample Diluent* und des *Standard 2* mit 50 mIU/mL verglichen.

Ist die Farbintensität der Probe geringer als die des *Standard 2* mit 50 mIU/mL, ist die Probe als negativ zu betrachten.

Ist die Farbintensität der Probe gleich oder stärker als die des *Standard 2* mit 50 mIU/mL, ist die Probe als positiv zu betrachten.

## 7 ERWARTETE WERTE

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

### 7.1 Gesunde, nicht schwangere Erwachsene

In einer Studie wurden die Proben von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem DEMEDITEC HCG ELISA folgende Werte:

Population	Alter (Jahre)	N	hCG [mIU/ml]
Männer	< 50	40	< 5
	> 50	10	< 5
Frauen	< 50	42	< 5
	> 50	7	< 5

### 7.2 Serum-hCG-Werte in der Schwangerschaft

Schwangerschafts- woche	Concentration mIU/mL	Schwangerschafts- woche	Concentration mIU/mL
2.-3.	10 - 50	13.	12500 - 95000
4.	40 - 1000	14.	10500 - 80000
5.	400 - 20700	15.	9000 - 70000
6.	2200 - 74200	16.	7000 - 64000
7.	6000 - 130000	17.	5500 - 56000
8.	2900 - 190000	18.	4500 - 50000
9.	18500 - 205000	19.	3300 - 40000
10.	18000 - 200000	20.	2500 - 32000
11.	16500 - 180000	21.	1800 - 25000
12.	14500 - 125000		

Anmerkung: Bei Spontanaborten und bei Vorliegen einer ektopischen Schwangerschaft werden niedrigere Werte ermittelt. (Siehe hierzu: Braunstein, G. a.o., First-trimester chorionic gonadotropin measurements as an aid in the diagnosis of early pregnancy disorders. In: American Journal of Obstetrics and Gynaecology, V. 131, No. 1., pp. 25-32. May 1978, St. Louis)

### ACHTUNG:

- Für den Schwangerschaftsnachweis mit der qualitativen Methode werden 50 mIU/mL als Grenzwert eingesetzt. Proben mit negativem oder grenzwertigem Ergebnis werden als zweifelhaft betrachtet. Zur Bestätigung des Ergebnisses 48 Stunden später eine weitere Patientenprobe nehmen und nochmals bestimmen.
- Es hat sich gezeigt, dass bei einem immunologischen Schwangerschaftstest einige Erkrankungen (rheumatische Arthritis, maligne Tumore) das Testergebnis beeinflussen können. In solchen Fällen muß die Interpretation der Ergebnisse besonders sorgfältig durchgeführt werden.



## 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 5 – 1000 mIU/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 *Sample Diluent* ( $n = 20$ ), beträgt  $< 5$  mIU/mL.

Die Daten zu:

### 9.4 Präzision

### 9.5 Wiederfindung

### 9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

## 10 GRENZEN DES TESTS

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

### 10.1 Interferenzen

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0,5 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 30 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

### 10.2 Beeinflussung durch Medikamente

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

### 10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook Effekt tritt bei Proben mit bis zu 13.300 mIU/mL hCG 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 REFERENZEN

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

## 1 INTRODUZIONE

Il test immuno-enzimatico **DEMEDIATEC HCG ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa di gonadotropina corionica (hCG) in siero e plasma.

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

## 2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test kit DEMEDIATEC HCG ELISA è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati su un substrato (ELISA) basato sul principio sandwich.

I micropozzetti sono ricoperti con un anticorpo monoclonale diretto contro un unico sito antigenico su una molecola hCG. Un'aliquota di un campione di paziente contenente hCG endogeno/a viene incubato nel pozzetto ricoperto dell'enzima coniugato, che è un anticorpo monoclonale (anti- $\alpha$ -subunit) coniugato alla perossidasi di rafano. Dopo l'incubazione il coniugato non legato è eliminato attraverso lavaggi.

La quantità della perossidasi legata è proporzionale alla concentrazione hCG nel campione.

Dopo l'aggiunta della soluzione substrato l'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di hCG nel campione del paziente.

## 3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- 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 Demeditec Diagnostics GmbH. I regolamenti di sicurezza corrispondono alle norme EU 91/155 EC.

## 4 COMPONENTI DEL KIT

### 4.1 Contenuto del kit

1. **Microtiterwells** (Micropozzetti), 12x8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti; Pozzetti ricoperti con l'anti-hCG anticorpo (monoclonale)
2. **Standard (Standard 1-5)**, 5 flaconi (liofilizzati), 1,0 mL; Concentrazione: 5; 50; 200; 500; 1000 mIU/mL  
Conversione: 1 pg/mL = 0,00916 mIU/ml  
*Gli standard sono calibrati contro lo Standard Internazionale Reference reagent 2001 (NIBSC Code number 99/688)*  
Vedi "preparazione dei reagenti".  
\* Contiene 0,03% Proclin 300, 0,015% BND e 0,010% MIT come conservante.
3. **Sample Diluent** (Diluente dei campioni), 1 flacone, 10 mL, pronto all'uso 0 mIU/mL  
\* Contiene 0,03% Proclin 300, 0,015% BND e 0,010% MIT come conservante.
4. **Enzyme Conjugate** (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 11 mL, pronto all'uso  
Anticorpo monoclonale (anti- $\alpha$ -subunit) coniugato alla perossidasi di rafano  
\* Contiene 0,03% Proclin 300, 0,015% BND e 0,010% MIT come conservante.
5. **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; TMB (benzidine tetrametilico).
6. **Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; contiene 1 N acidic solution.  
Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.

- \* BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane  
MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

**Nota:** Ulteriore *Sample Diluent* può essere richiesto alla ditta.

### 4.2 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450±10 nm)
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile.
- Carta assorbente.
- Acqua distillata.

### 4.3 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2 °C - 8 °C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data.

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 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.

#### **Standards**

Ricostituire il contenuto liofilizzato dei flaconi con gli standard con 1,0 mL acqua distillata.

**Nota:** *Gli standard ricostituiti sono stabili per 2 mesi a 2 °C - 8 °C. Per periodi piu' lunghi congelare a -20 °C.*

### 4.5 Smaltimento del kit

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

#### 4.6 Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta DEMEDITEC, al 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-, Eparina- or citrate plasma) 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 # 02.1388.001), 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 e centrifugando immediatamente dopo la puntura.

(P.es. per EDTA plasma Sarstedt Monovette – red cap - # 02.166.001;  
per eparina plasma Sarstedt Monovette – orange cap - # 02.165.001;  
per citrate plasma Sarstedt Monovette – green cap - # 02.167.001.)

#### 5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere magazzinati ben chiusi fino a 5 giorni 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

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

Della diluizione deve essere però tenuto conto.

##### Esempio:

- a) diluizione 1:10: 10 µL siero + 90 µL *Sample Diluent* (agitare bene)
- b) diluizione 1:100: 10 µL della diluizione a) + 90 µL *Sample Diluent* (agitare bene).

**NOTA:** I sieri di donne gravide devono essere diluiti 1:100 nel *Sample Diluent* prima di incominciare l'analisi.

### 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 Esecuzione del test (metodo quantitativo)

Ogni analisi deve includere una curva standard.

**NOTA:** I sieri di donne gravide devono essere diluiti 1:100 nel *Sample Diluent* prima di incominciare l'analisi.

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Pipettare **25 µL** di ogni *Standard*, *Control* e campione nei pozzetti, cambiando ogni volta la punta monouso.
3. Pipettare **100 µL** *Enzyme Conjugate* in ogni pozzetto. Agitare bene per 10 secondi. È molto importante raggiungere un completo mescolamento.
4. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
5. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti. Lavare i pozzetti 5 volte con acqua distillata (400 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 esecuzione del lavaggio!
6. Aggiungere **100 µL** della *Substrate Solution* ad ogni pozzetto.
7. Incubare per **10 minuti** a temperatura ambiente.
8. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **50 µL** della *Stop Solution* ad ogni pozzetto.
9. 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 Esecuzione del test (metodo qualitativo)

Questo procedimento distingue campioni positivi (gravidanza) da campioni negativi comparando i livelli hCG con quelli del *Sample Diluent* (0 mIU/mL) e dello *Standard 2* (50 mIU/mL).

I campioni dei pazienti vanno analizzati assieme al *Sample Diluent* (0 mIU/mL) e allo *Standard 2* (50 mIU/mL).

Il procedimento del test è identico a quello del metodo quantitativo; soltanto i passaggi 9 e 10 sono omessi.

## 6.4 Rilevamento dei risultati (quantitativo)

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

### 6.4.1 Esempio di una curva standard

I seguenti dati sono a scopo dimostrativo soltanto e **non possono** sostituire i dati generati dall'esecuzione del test.

Standard	Densità ottiche (450 nm)
Standard 1 (5 mIU/mL)	0,05
Standard 2 (50 mIU/mL)	0,14
Standard 3 (200 mIU/mL)	0,43
Standard 4 (500 mIU/mL)	0,94
Standard 5 (1000 mIU/mL)	1,54

## 6.5 Risultati qualitativi

Per una analisi qualitativa dei livelli hCG lo sviluppo del colore dei campioni e' paragonato a quello del *Sample Diluent* (0 mIU/mL) e dello *Standard 2* (50 mIU/mL).

Se il colore blu e' meno intenso di quello dello *Standard 2* (50 mIU/mL), il campione e' da considerare negativo.

Se il colore blu e' piu' intenso o uguale a quello dello *Standard 2* (50 mIU/mL), il campione e' da considerare positivo.

## 7 VALORI NORMALI

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

### 7.1 Adulti normali sani, non in gravidanza

In uno studio condotto su persone apparentemente sane usando il test DEMEDITEC HCG ELISA i seguenti valori sono stati ottenuti:

Popolazione	Età (anni)	N Valori	hCG [mIU/ml]
Uomini	< 50	40	< 5
	> 50	10	< 5
Donne	< 50	42	< 5
	> 50	7	< 5

### 7.2 Livelli normali di hCG nel siero durante la gravidanza

settimana di gravidanza	Concentration mIU/mL	settimana di gravidanza	Concentration mIU/mL
2.-3.	10 - 50	13.	12500 - 95000
4.	40 - 1000	14.	10500 - 80000
5.	400 - 20700	15.	9000 - 70000
6.	2200 - 74200	16.	7000 - 64000
7.	6000 - 130000	17.	5500 - 56000
8.	2900 - 190000	18.	4500 - 50000
9.	18500 - 205000	19.	3300 - 40000
10.	18000 - 200000	20.	2500 - 32000
11.	16500 - 180000	21.	1800 - 25000
12.	14500 - 125000		

Durante le prime sei settimane di gravidanza, la concentrazione di hCG nel siero ha un tempo di raddoppiamento di circa due giorni.

Dopo il parto i livelli hCG cadono rapidamente e diventano zero dopo pochi giorni.

Valori molto bassi di hCG possono essere trovati in casi di gravidanza ectopica (extra uterina) (vedi Braunstein, G. a.o., First-trimester chorionic gonadotropin measurements as an aid in the diagnosis of early pregnancy disorders. In: American Journal of Obstetrics and Gynaecology, V. 131, No. 1., pp. 25-32. May 1978, St. Louis), mentre casi di coriocarcinoma, neoplasie trofoblastiche o non trofoblastiche o mola idatiforma possono presentare concentrazioni molto alti di hCG.

### PRECAUZIONI:

1. Per la determinazione di gravidanza, si usa il procedimento qualitativo, con un valore soglia di 50 mIU/mL. Risultati negativi o borderline dovrebbero essere ripetuti con campioni freschi al piu' tardi 48 ore dopo l'analisi dei primi campioni.
2. E' stato riportato che test di gravidanza immunologici possono risultare falsi in casi di malattie gravi (come artrite reumatica o mieloma). In questi casi il test di gravidanza dovrebbe essere interpretato con molta precisione.

## 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.

È altresì consigliabile di partecipare a programmi di sicurezza sulla qualità nazionali o internazionali, per assicurarsi dell'esattezza 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 magazzino e d'incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio.

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

## 9 CARATTERISTICHE DEL TEST

### 9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 5 – 1000 mIU/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 *Sample Diluent* ed erano < 5 mIU/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

Emoglobina (fino a 4 mg/mL), bilirubina (fino a 0,5 mg/mL) e trigliceridi (fino a 30 mg/mL) non influenzano i risultati di questo test.

### 10.2 Droghe interferenti

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

### 10.3 Effetto Hook di alti dosaggi

Nessun effetto hook (di agglomerazione) è stato osservato in questo test fino a 13.300 mIU/mL di hCG.



## 11 ASPETTI LEGALI

### 11.1 Affidabilità dei risultati

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

### 11.2 Conseguenze terapeutiche

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

### 11.3 Responsabilità legali

Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento.

Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2. Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

## 12 BIBLIOGRAFIA

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

## 1 INTRODUCCIÓN

El **Kit de inmunoensayo enzimático DEMEDITEC HCG** proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del Gonadotropina coriónica (HCG) en suero y plasma.

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

## 2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

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

Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo monoclonal dirigido contra un único foci antigénico en una molécula de HCG. Se incubaba una alícuota de una muestra perteneciente a un paciente que contiene HCG endógena en los pocillos recubiertos con el enzima conjugado, que es un anticuerpo monoclonal (anti- $\alpha$ -subunit) conjugado con la peroxidasa endógena. Después de la incubación se lava el conjugado que no se ha unido.

La cantidad de peroxidasa unida es proporcional a la concentración de HCG en la muestra.

Cuando se añade la solución del sustrato de la peroxidasa, la intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de HCG en la muestra del paciente.

## 3 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*.
- Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
- Evitar contacto con *Stop Solution* que contiene  $H_2SO_4$  0,5 M. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
- No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
- Usar guantes de látex cuando se utilicen las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede dar resultados erróneos.
- El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
- Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar diferentes.
- Los compuestos químicos y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- Las hojas de los datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a Demeditec Diagnostics GmbH.

Las hojas de los datos de seguridad se ajustan a las demandas de la guía europea: EU-Guideline 91/155 EC.

## 4 COMPONENTES DEL KIT

### 4.1 Componentes del Kit

1. **Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12x8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti-HCG (monoclonal).
2. **Standard (Standard 1-5)**, (Estándar), 5 viales (liofilizados), 1,0 mL; Concentraciones: 5; 50; 200; 500; 1000 mIU/mL  
Conversión: 1 pg/mL = 0,00916 mIU/mL  
Los estándares están calibrados según el material de referencia "*Chorionic Gonadotropin, Reference reagent 2001*" (NIBSC código 99/688),  
Ver "Preparación de los Reactivos";  
\* Contiene 0,03% Proclin 300, 0,015% BND y 0,010% MIT como conservante.
3. **Sample Diluent** (Solución para dilución de la muestra), 1 vial, 10 mL, listo para usar, 0 mIU/mL  
\* Contiene 0,03% Proclin 300, 0,015% BND y 0,010% MIT como conservante.
4. **Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático), 1 vial, 11 mL, listo para usar, Anticuerpo (anti- $\alpha$ -subunit) conjugado con la Peroxidasa de rábano;  
\* Contiene 0,03% Proclin 300, 0,015% BND y 0,010% MIT como conservante.
5. **Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 14 mL, listo para usar, Tetrametilbencidina (TMB).
6. **Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar, contiene 1 N ácida solución.  
Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en la piel.

- \* BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane (Bromonitrodioxano)  
MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (Metilisotiazolona)

**Note:** Se puede solicitar el *Sample Diluent* para la dilución de la muestra.

### 4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450 nm  $\pm$  10 nm)
- Micropipetas de precisión variable calibradas.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

### 4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

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

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

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

### 4.4 Preparación de los Reactivos

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

#### Standards

Reconstituir los contenidos liofilizados de los viales de los estándares con 1,0 mL de agua destilada.

**Nota:** Los estándares reconstituidos son estables durante 2 meses a 2 °C - 8 °C. Para períodos más largos congelar a -20 °C.

### 4.5 Eliminación del Kit

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

## 4.6 Kits de ensayo dañados

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

## 5 MUESTRAS

En este ensayo pueden usarse suero o plasma (plasma EDTA, Heparina o citrato).

No usar muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas.

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

### 5.1 Toma de muestras

#### Suero:

Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), permitir coagulación, y separar el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugar antes de la coagulación completa. Las muestras de pacientes que reciben terapia anticoagulante requieren más tiempo para coagular.

#### Plasma:

Toda la sangre ha de recogerse en tubos de centrífuga que contengan anticoagulante y centrifugar inmediatamente tras la recogida.

(Ej. Para plasma EDTA Sarstedt Monovette – tapa roja - # 02.166.001;  
para plasma Heparina Sarstedt Monovette – tapa naranja - # 02.165.001;  
para plasma Citrato Sarstedt Monovette – tapa verde - # 02.167.001.)

### 5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 5 días a 2 °C - 8 °C antes del ensayo. Las muestras almacenadas por un período de tiempo más largo han de congelarse sólo una vez a -20 °C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

### 5.3 Dilución de las muestras

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

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

#### Ejemplo:

- a) dilución 1:10: 10 µL Suero + 90 µL *Sample Diluent* (mezclar totalmente)  
b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL *Sample Diluent* (mezclar totalmente).

**NOTA:** El suero de las mujeres embarazadas debe diluirse 1/100 en el diluyente de las muestras antes de comenzar el ensayo.

## 6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

### 6.1 Consideraciones generales

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

## 6.2 Procedimiento de ensayo (Método Cuantitativo)

Cada uno debe incluir una curva de estándares.

**NOTA:** El suero de las mujeres embarazadas debe diluirse 1/100 en el diluyente de las muestras antes de comenzar el ensayo. (ver 5.3)

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **25 µL** de cada *Standard*, *Control* y muestras con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Dispensar **100 µL** de *Enzyme Conjugate* a cada pocillo.  
Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
4. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente.
5. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.  
Lavar los pocillos 5 veces con agua destilada (400 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.

**Nota importante:**

La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!

6. Adicionar **100 µL** de *Substrate Solution* a cada pocillo.
7. Incubar durante **10 minutos** a temperatura ambiente.
8. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **50 µL** de *Stop Solution* a cada pocillo.
9. Leer la OD a **450±10 nm** con un lector de microplacas **dentro de los 10 minutos** después de la adición de la *Stop Solution*.

## 6.3 Procedimiento de ensayo (Método Cualitativo)

Este procedimiento diferencia entre muestras positivas (embarazada) y negativas mediante la comparación de los niveles de hCG de la muestra con el diluyente de las muestras (0 mIU/mL) y el estándar 2 (50 mIU/mL).

Las muestras de pacientes se corren en paralelo con el diluyente de las muestras (0 mIU/mL) y el estándar 2 (50 mIU/mL).

El procedimiento de ensayo es idéntico con el Método cuantitativo, pero se omiten los pasos 9 y 10.

## 6.4 Cálculo de los Resultados (Cuantitativo)

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

### 6.4.1 Ejemplo de una Curva Estándar Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y no pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

Estándar	Unidades Ópticas (450 nm)
Standard 1 (5 mIU/mL)	0.05
Standard 2 (50 mIU/mL)	0.14
Standard 3 (200 mIU/mL)	0.43
Standard 4 (500 mIU/mL)	0.94
Standard 5 (1000 mIU/mL)	1.54

### 6.5 Resultados Cualitativos

Para un análisis cualitativo de los niveles de hCG el desarrollo del color de la muestra se compara con el color del diluyente de las muestras (0 mIU/mL) y del estándar 2 (50 mIU/mL).

Si el color azul es menos intenso que el color del estándar 2 (50 mIU/mL) la muestra se considera negativa.

Si el color azul es más intenso que el color del estándar 2 (50 mIU/mL) la muestra se considera positiva.

## 7 VALORES ESPERADOS

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

### 7.1 Adultos normales sanos, no embarazadas

En un estudio con adultos aparentemente sanos utilizando el DEMEDITEC HCG ELISA se observaron los siguientes valores:

Población	Edad (años)	N válido	hCG [mIU/mL]
Hombres	< 50	40	< 5
	> 50	10	< 5
Hombres	< 50	42	< 5
	> 50	7	< 5

### 7.2 Niveles normales de hCG en suero durante el embarazo

semana de embarazo	Concentration mIU/mL	semana de embarazo	Concentration mIU/mL
2.-3.	10 - 50	13.	12500 - 95000
4.	40 - 1000	14.	10500 - 80000
5.	400 - 20700	15.	9000 - 70000
6.	2200 - 74200	16.	7000 - 64000
7.	6000 - 130000	17.	5500 - 56000
8.	2900 - 190000	18.	4500 - 50000
9.	18500 - 205000	19.	3300 - 40000
10.	18000 - 200000	20.	2500 - 32000
11.	16500 - 180000	21.	1800 - 25000
12.	14500 - 125000		

Durante las primeras seis semanas de embarazo, las concentraciones de hCG en suero se doblan aproximadamente de dos días.

Después del parto, los niveles de hCG caen rápidamente y desaparecen completamente a los pocos días.

Niveles muy bajos de hCG pueden presentarse en embarazos ectópicos (ver Braunstein, G. a.o., First-trimester chorionic gonadotropin measurements as an aid in the diagnosis of early pregnancy disorders. In: American Journal of Obstetrics and Gynaecology, V. 131, No. 1., pp. 25-32. May 1978, St. Louis), mientras que condiciones como coriocarcinoma, neoplasmas trofoblasticos o no trofoblasticos o mola hidatiforme pueden mostrar concentraciones muy elevadas de hCG.

**PRECAUCIÓN:**

1. Para la detección del embarazo en suero, se utiliza un ensayo cualitativo con un punto límite de 50 mIU/mL. Deben repetirse los resultados negativos o dudosos con una muestra fresca obtenida al menos 48 horas tras la primera muestra.
2. Se ha visto que los ensayos inmunológicos de embarazo pueden dar falsos resultados en casos de varias enfermedades (como artritis reumatoide y mielomas).  
En esos casos, la interpretación de los ensayos de embarazo han de realizarse cuidadosamente.

**8 CONTROL DE CALIDAD**

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

Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados. Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados.

Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos.

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

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

**9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO****9.1 Rango dinámico del ensayo**

El rango del ensayo se encuentra entre 5 – 1000 mIU/mL.

**9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)**

Consultar el manual de usuario en inglés.

**9.3 Sensibilidad Analítica**

La sensibilidad analítica se calculó a partir de la media mas dos desviaciones estándar de veinte (20) réplicas del *Sample Diluent* y resultó ser < 5 mIU/mL.

**9.4 Precisión**

Consultar el manual de usuario en inglés.

**9.5 Recuperación**

Consultar el manual de usuario en inglés.

**9.6 Linealidad**

Consultar el manual de usuario en inglés.

## 10 LIMITACIONES DE USO

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

### 10.1 Sustancias que pueden interferir

Hemoglobina (hasta 4 mg/mL), Bilirrubina (hasta 0.5 mg/mL) y Triglicéridos (hasta 30 mg/mL) no influyen los resultados del ensayo.

### 10.2 Interferencias con drogas

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

### 10.3 Efecto Gancho-Dosis-Elevada

No se ha observado efecto gancho en este ensayo hasta 13000 mIU/mL de HCG.

## 11 ASPECTOS LEGALES

### 11.1 Fiabilidad de los Resultados

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

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

### 11.2 Consecuencias Terapéuticas

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

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

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

### 11.3 Responsabilidad

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

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

## 12 REFERENCIAS

Consultar el manual de usuario en inglés.



## 1 INTRODUCTION

Le kit de dosage immuno-enzymatique **DEMEDIATEC HCG ELISA** propose les matériaux requis pour la mesure quantitative de gonadotrophine chorionique humaine (HCG) dans le sérum ou le plasma.

**Ce kit est à utiliser uniquement dans le cadre de tests diagnostiques in vitro.**

## 2 PRINCIPE DU TEST

Le kit DEMEDIATEC HCG ELISA est basé sur une réaction immuno-enzymatique en sandwich en phase solide.

Les microplaques sont recouvertes avec un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène spécifique de la molécule HCG. Un aliquot de l'échantillon contenant le (la) HCG endogène est incubé dans un puits avec l'enzyme conjuguée, c'est-à-dire un anticorps (anti- $\alpha$ -subunit) monoclonal conjuguée avec la peroxidase de Raifort (horseradish peroxidase, HRP). Après l'incubation, le conjugué non-lié est éliminé durant le lavage des puits.

La quantité de conjugué-HRP liée est proportionnelle à la concentration de HCG contenu(e) dans l'échantillon.

Suite à l'addition de solution substrat, l'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la concentration de HCG contenu(e) dans l'échantillon.

## 3 PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Ce kit est uniquement destiné aux tests diagnostiques in vitro.
- Les informations concernant la toxicité des réactifs contenus dans ce kit sont présentées dans la fiche de sécurité (« Material Safety Data Sheets »).
- Tous les réactifs de ce kit contenant du sérum ou du plasma humain ont été testés avec des résultats négatifs pour le VIH I/II, le HBsAg et le HCV selon les normes FDA en vigueur. Néanmoins, lors de leur utilisation, tous les réactifs de ce kit doivent être manipulés avec précaution.
- Eviter les contacts avec la *Stop Solution*, celle-ci contient 0.5 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Cela pourrait engendrer irritations ou brûlures de la peau.
- Ne jamais pipeter avec la bouche, et éviter tout contact de la peau ou des muqueuses avec les réactifs ou les échantillons.
- Ne pas fumer, manger, boire ou utiliser des produits cosmétiques dans les zones où les échantillons ou le kit ont été maniés.
- Porter des gants d'examen lors de l'utilisation des échantillons ou des réactifs. Une contamination microbienne des échantillons ou des réactifs pourrait fausser les résultats.
- L'utilisation de ce kit devra être en accord avec les normes ou recommandations nationales de sécurité en vigueur concernant les produits à risque biologique.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date d'expiration inscrite sur l'emballage.
- Tous les volumes indiqués doivent être scrupuleusement respectés, comme indiqué dans le protocole expérimental. Seule l'utilisation de pipettes calibrées ou d'un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques calibré garantit l'obtention de résultats optimaux à ce test.
- Ne pas mélanger ou utiliser des réactifs contenus dans des kits de lots différents. Il est conseillé de ne pas échanger les puits de différentes plaques, même si celles-ci proviennent du même lot. Les kits peuvent avoir été transportés ou stockés différemment, et les caractéristiques de liaison de chaque plaque pourraient ainsi être modifiées.
- L'élimination des solutions chimiques et des réactifs contenus dans ce kit, utilisés ou non, doit être en accord avec la réglementation nationale en vigueur concernant l'élimination des déchets à risque biologique.
- La fiche de sécurité concernant ce produit peut être obtenue en contactant directement Demeditec Diagnostics GmbH. Les fiches de sécurité sont en accord avec les directives européennes EU 91/155 EC.

## 4 COMPOSITION DU KIT

### 4.1 Contenu du kit

1. **Microtiterwells** (Plaques de micro-titration), 12x8 (à détacher) barrettes, plaques de 96 puits; Les puits sont recouverts avec un anticorps anti-HCG (monoclonal).
2. **Standard (Standard 1-5)**, 5 flacons (lyophilisés), 1 mL; Concentrations: 5; 50; 200; 500; 1000 mIU/mL  
Conversion: 1 pg/mL = 0,00916 mIU/mL  
*Les standards ont été calibrés selon les références « Chorionic Gonadotropin, Reference reagent 2001 » (NIBSC code 99/688).*  
Voir « Préparation des réactifs » ;  
\* contient 0.03% de Proclin 300, 0.015% BND et 0.010% MIT comme agent de conservation.
3. **Sample Diluent** (Solution pour dilution de l'échantillon), 1 flacon, 10 mL, prêt à l'emploi, 0 mIU/mL  
\* contient 0.03% de Proclin 300, 0.015% BND et 0.010% MIT comme agent de conservation.
4. **Enzyme Conjugate** (Conjugué enzymatique), 1 flacon, 11 mL, prêt à l'emploi, Anticorps (anti- $\alpha$ -subunit) conjugué à la HRP;  
\* contient 0.03% de Proclin 300, 0.015% BND et 0.010% MIT comme agent de conservation.
5. **Substrate Solution** (Solution substrat), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi, Tétraméthylbenzidine (TMB).
6. **Stop Solution** (Solution d'arrêt), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi, contient 1N acide solution.  
Eviter les contacts avec la solution stop. Cela pourrait engendrer irritations ou brûlures de la peau.

- \* BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane (Bromonitrodioxane)  
MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (Méthyliisothiazolone)

**Remarque :** Un *Sample Diluent* pour la dilution de l'échantillon peut être fourni sur demande.

### 4.2 Equipement et matériel requis, mais non fournis

- Un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques calibré ( $450 \pm 10$  nm)
- Des micro-pipettes de précision variables et calibrées.
- Du papier absorbant.
- De l'eau distillée.

### 4.3 Stockage et stabilité du kit

Les réactifs contenus dans des flacons non-ouverts, stockés à 2-8 °C, seront stables jusqu'à la date d'expiration inscrite sur l'étiquette. Ne pas utiliser les réactifs au delà de cette date.

Les réactifs contenus dans des flacons ouverts doivent être stockés à 2 °C - 8 °C. Les micro-plaques doivent être stockées à 2 °C - 8 °C. Une fois la capsule d'aluminium ouverte, attention à bien refermer le flacon.

Les kits ouverts conservent leur activité s'ils sont stockés comme précédemment mentionné.

### 4.4 Préparation des réactifs

Amener tous les réactifs et le nombre de barrettes nécessaires au test à température ambiante avant utilisation.

#### **Standards**

Reconstituer le contenu lyophilisé des flacons de standards avec 1,0 mL d'eau distillée.

**Remarque :** Les standards reconstitués sont stables deux mois à 2 °C - 8 °C.

Pour un stockage prolongé, congeler à -20 °C.

### 4.5 Elimination des déchets relatifs au kit

L'élimination des déchets relatifs au kit doit être réalisée selon les règles nationales en vigueur. Les informations spécifiques au kit sont présentées dans la fiche de sécurité (voir chapitre 13).

## 4.6 Kits endommagés

Dans le cas de dommages importants survenus au kit ou ses composants, informer la DEMEDITEC, au plus tard une semaine après réception du kit. Les composants endommagés ne doivent pas être utilisés pour le test. Ils doivent être stockés jusqu'à ce qu'une solution adaptée ait été trouvée. Après cela, ils doivent être éliminés selon les directives officielles en vigueur.

## 5 ECHANTILLON

Sérum ou plasma (EDTA-, Héparine- ou citrate plasma) peuvent être utilisés pour ce test.

Ne pas utiliser des échantillons hémolysés, ictériques ou lipémiques.

Remarque : Les échantillons contenant de l'azide de sodium ne doivent pas être utilisés pour ce test.

### 5.1 Prélèvement et préparation des échantillons

#### Sérum:

Prélever le sang par ponction veineuse (ex. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), laisser coaguler, puis séparer le sérum par centrifugation à température ambiante. Ne pas centrifuger avant que la coagulation ne soit terminée. Les patients sous traitement anti-coagulant peuvent demander un temps de coagulation plus important.

#### Plasma:

Le sang total doit être prélevé dans des tubes de centrifugation contenant un anti-coagulant et centrifugé immédiatement après le prélèvement.

(ex. pour EDTA plasma : Sarstedt Monovette – bouchon rouge - # 02.166.001;

pour héparine plasma : Sarstedt Monovette – bouchon orange - # 02.165.001;

pour citrate plasma : Sarstedt Monovette – bouchon vert - # 02.167.001.)

### 5.2 Conservation des échantillons

Les tubes contenant les échantillons doivent être fermés et peuvent être stockés jusqu'à cinq jours à 2 °C - 8 °C avant d'être testés.

Les échantillons stockés pour un temps prolongé doivent être congelés à -20°C avant d'être testés. Les échantillons décongelés doivent être retournés plusieurs fois avant le test.

### 5.3 Dilution de l'échantillon

Si, lors d'un test préliminaire, la concentration de l'échantillon se révèle être supérieure à celle du standard le plus concentré, alors l'échantillon doit être dilué avec le *Sample Diluent* et testé de nouveau, comme décrit dans Réalisation du test.

Pour le calcul des concentrations, ce facteur de dilution doit être pris en considération.

#### Exemple:

a) dilution 1:10: 10 µL Sérum + 90 µL *Sample Diluent* (bien mélanger).

b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Sample Diluent* (bien mélanger).

**Remarque:** les sérums de femmes enceintes doivent être dilués au 1/100e dans le tampon de dilution d'échantillon (*Sample Diluent*) avant de commencer l'essai.

## 6 RÉALISATION DU TEST

### 6.1 Remarques générales

- Tous les réactifs et échantillons doivent être amenés à température ambiante avant utilisation. Tous les réactifs doivent être mélangés, sans formation de mousse.
- Une fois la procédure engagée, toutes les étapes doivent être réalisées sans interruption.
- Utiliser un nouveau cône de pipette pour chaque standard, contrôle ou échantillon, ceci afin d'éviter toute contamination.
- L'absorbance est fonction du temps d'incubation et de la température. Avant de commencer le test, il est recommandé de préparer tous les réactifs, bouchons ouverts, de préparer les puits des microplaques, etc. Cela garantira un intervalle de temps équivalent entre chaque étape, sans interruption.
- En règle générale, la réaction enzymatique est linéairement proportionnelle au temps et à la température.

## 6.2 Réalisation du dosage (méthode quantitative)

Chaque test doit inclure une courbe étalon.

**Remarque:** les sérums de femmes enceintes doivent être dilués au 1/100e dans le tampon de dilution d'échantillon (*Sample Diluent*) avant de commencer l'essai. (Voir 5.3.)

1. Disposer le nombre de puits de micro-titration désiré dans le support.
2. Déposer **25 µL** de chaque *Standard*, *Control* et les échantillons, avec de nouveaux cônes de pipette, dans les puits appropriés.
3. Déposer **100 µL** d'*Enzyme Conjugate* dans chaque puits.  
Bien mélanger pendant 10 secondes. Il est important d'obtenir un mélange parfait lors de cette étape.
4. Incuber pendant **30 minutes** à température ambiante.
5. Décanter le contenu des puits et rincer les puits **5 fois** avec de l'eau distillée (400 µL par puits). Tapoter les puits sur du papier absorbant afin d'éliminer les gouttelettes résiduelles.

**Remarque importante:**

La sensibilité et la précision de ce test sont fortement dépendantes de la bonne réalisation des étapes de lavage !

6. Ajouter **100 µL** de *Substrate Solution* à chaque puits.
7. Incuber pendant **10 minutes** à température ambiante.
8. Stopper la réaction enzymatique en ajoutant **50 µL** de *Stop Solution* à chaque puits.
9. Lire la densité optique à **450±10 nm** à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques **dans les 10 minutes** après avoir ajouté la *Stop Solution*.

## 6.3 Protocole d'essai (méthode qualitative)

Ce protocole différencie les sérums positifs (enceinte) des échantillons négatifs, en comparant les taux d'hCG contenus dans les échantillons avec le tampon de dilution (0 mIU/mL) et le standard 2 (50 mIU/mL). Les échantillons de patients sont traités en parallèle du tampon de dilution (0 mIU/mL) et le standard 2 (50 mIU/mL).

Le protocole d'essai est identique celui de la méthode quantitative, mais les étapes 9 et 10 sont omises.

## 6.4 Calcul des résultats (quantitative)

1. Calculer les valeurs moyennes des densités optiques pour chaque série de standards, contrôles et échantillons.
2. Etablir la courbe étalon en reportant la densité optique moyenne de chaque valeur standard en fonction de sa concentration, en posant la densité optique en axe des ordonnées et la concentration en axe des abscisses.
3. L'utilisation de la densité optique moyenne pour chaque échantillon détermine la concentration correspondante à partir de la courbe étalon.
4. Méthode automatique. Les résultats dans le IFU ont été calculés de façon automatique en utilisant une courbe de régression 4 PL (4 Parameter Logistics). D'autres fonctions logistiques peuvent donner des résultats légèrement différents.
5. La concentration des échantillons peut être lue directement à partir de cette courbe étalon. Les échantillons avec une concentration supérieure à celle du plus haut standard doivent être dilués de nouveau. Pour le calcul des concentrations, ce facteur de dilution doit être pris en considération.

### 6.4.1 Exemple typique de courbe étalon

Les résultats suivants sont ici présentés à titre d'exemple et **ne peuvent** être utilisés au moment de l'essai.

Standard	Unités optiques (450 nm)
Standard 1 (5 mIU/mL)	0,05
Standard 2 (50 mIU/mL)	0,14
Standard 3 (200 mIU/mL)	0,43
Standard 4 (500 mIU/mL)	0,94
Standard 5 (1000 mIU/mL)	1,54

### 6.5 Résultats qualitatifs

Pour une analyse qualitative du taux d'hCG, le développement coloré de l'échantillon est comparé à la couleur du tampon de dilution (0 mIU/mL) et du standard 2 (50 mIU/mL).

Si la couleur bleue est moins intense que la couleur du standard 2 (50 mIU/mL), l'échantillon est alors considéré comme négatif.

Si la couleur bleue est plus intense ou équivalente à celle du standard 2 (50 mIU/mL), l'échantillon est alors considéré comme positif.

## 7 VALEURS ATTENDUES

Il est fortement recommandé à chaque laboratoire de déterminer ses propres valeurs normales ou anormales.

### 7.1 Adultes normaux sains, non enceintes

Dans une étude réalisée avec des adultes normaux et sains, à l'aide du kit DEMEDITEC HCG ELISA, les valeurs suivantes sont observées :

Population	Age (ans)	Valid N	hCG [mIU/mL]
Hommes	< 50	40	< 5
	> 50	10	< 5
Hommes	< 50	42	< 5
	> 50	7	< 5

### 7.2 Taux d'hCG sériques normaux au cours de la grossesse

semaine de grossesse	Concentration mIU/mL	semaine de grossesse	Concentration mIU/mL
2.-3.	10 - 50	13.	12500 - 95000
4.	40 - 1000	14.	10500 - 80000
5.	400 - 20700	15.	9000 - 70000
6.	2200 - 74200	16.	7000 - 64000
7.	6000 - 130000	17.	5500 - 56000
8.	2900 - 190000	18.	4500 - 50000
9.	18500 - 205000	19.	3300 - 40000
10.	18000 - 200000	20.	2500 - 32000
11.	16500 - 180000	21.	1800 - 25000
12.	14500 - 125000		

Au cours des six premières semaines de grossesse, les concentrations d'hCG sériques présentent un temps de doublement d'environ 2 jours. Suite à la délivrance, les taux d'hCG chutent rapidement, pour disparaître complètement après quelques jours.

De faibles taux d'hCG peuvent être détectés lors de grossesses ectopiques (voir Braunstein, G. a.o., First-trimester chorionic gonadotropin measurements as an aid in the diagnosis of early pregnancy disorders. In: American Journal of Obstetrics and Gynaecology, V. 131, No. 1., pp. 25-32. May 1978, St. Louis), alors que des conditions telles que des choriocarcinomes, des néoplasmes trophoblastiques ou non-trophoblastiques, ou encore des moles hydatiformes, peuvent engendrer de très fortes concentrations d'hCG.

**Précautions:**

1. Pour la détection d'une grossesse dans un sérum, un essai qualitatif est utilisé avec un point limite de 50 mIU/mL. Des résultats négatifs ou à la limite doivent être répétés à partir d'échantillons frais obtenus au moins 48 heures après le premier prélèvement.
2. Il a été montré que des tests immunologiques de grossesse peuvent amener à de faux résultats en cas de pathologies sévères (telles que l'arthrite rhumatoïde ou les myélomes).

**8 CONTROLE DE QUALITE**

Il est recommandé d'utiliser les échantillons contrôles selon les réglementations nationales en vigueur. L'utilisation des échantillons contrôles est recommandée afin de s'assurer jour après jour de la validité des résultats. Utiliser les contrôles de valeurs normales et pathologiques.

Les contrôles et les résultats correspondants issus du laboratoire QC sont mentionnés dans le certificat QC fourni avec le kit. Les valeurs et les limites mentionnées sur la fiche QC font toujours référence au lot de kit courant et doivent être utilisées pour une comparaison directe avec les résultats.

Il est également recommandé d'utiliser les programmes d'évaluation de qualité nationaux ou internationaux, afin de s'assurer de l'exactitude des résultats.

Utiliser les méthodes d'analyses statistiques appropriées pour l'analyse des valeurs contrôles et des tendances. Si les résultats ne correspondent pas aux limites établies des contrôles, les résultats concernant ces patients doivent être considérées comme non valides.

Dans ce cas, tester les zones techniques suivantes : mécanisme de pipetage et temps; spectrophotomètre, dates d'expiration des réactifs, conditions de stockage et d'incubation, méthodes d'aspiration et de lavage. Après avoir tester les points mentionnés, si aucune erreur n'est détectée, contacter votre distributeur ou directement la DEMEDITEC.

**9 CARACTERISTIQUES DU TEST****9.1 Zone de mesure**

Les limites du dosage sont comprises entre 5 – 1000 mIU/mL.

**9.2 Spécificité des anticorps (Réaction croisée)**

Voir le manuel d'utilisateur en version anglaise.

**9.3 Sensibilité de l'analyse**

La sensibilité de l'analyse a été calculée à partir de la moyenne la plus élevée de deux déviations standards de l'analyse de vingt réplicats du *Sample Diluent* et a été mesurée à < 5 mIU/mL.

**9.4 Précision**

Voir le manuel de l'utilisateur en version anglaise.

**9.5 Recouvrement**

Voir le manuel de l'utilisateur en version anglaise.

**9.6 Linéarité**

Voir le manuel de l'utilisateur en version anglaise.

## 10 LIMITES D'UTILISATION

Toute utilisation impropre des échantillons ou toute modification du test peut influencer les résultats.

### 10.1 Substances parasites

L'hémoglobine (jusqu'à 4 mg/mL), la bilirubine (jusqu'à 0.5 mg/mL) et les triglycérides (jusqu'à 30 mg/mL) n'ont aucune influence sur les résultats du dosage.

### 10.2 Drogues parasites

Jusqu'à présent, nous ne connaissons aucune substance (drogues) capable d'influencer la mesure de HCG dans un échantillon.

### 10.3 Effet de surdosage

Jusqu'à 13300 mIU/mL de HCG, aucun effet de surdosage n'a été détecté avec ce test.

## 11 ASPECTS LEGAUX

### 11.1 Fiabilité des résultats

Ce test doit être exactement utilisé selon les instructions d'utilisation du fabricant. De plus, les utilisateurs doivent strictement respecter les règles de la bonne pratique de laboratoire, ou autres lois nationales. Cela est spécialement le cas pour l'utilisation des réactifs contrôles. Pour chaque test, il est important d'inclure un nombre suffisant de contrôles, afin de pouvoir valider l'exactitude et la précision du test.

Les résultats du test sont valides si et seulement si tous les contrôles sont compris dans les gammes de mesure mentionnées et si tous les autres paramètres du test sont également compris dans les instructions de ce test. En cas de doute ou d'inquiétude, contacter la DEMEDITEC.

### 11.2 Conséquences thérapeutiques

Les suites thérapeutiques ne devront jamais être basées sur les résultats de laboratoire seuls, même si les tous les résultats du test sont en accord avec les points mentionnés dans le paragraphe 11.1. Tout résultat n'est qu'une partie du tableau clinique complet d'un patient.

Les suites thérapeutiques peuvent découler des résultats de laboratoire si et seulement si ceux-ci sont en accord avec l'ensemble du tableau clinique du patient.

Le résultat du test en lui-même ne doit en aucun cas être le seul déterminant des suites thérapeutiques à suivre.

### 11.3 Responsabilité











Toute modification du kit et / ou échange ou mélange d'un des composants de différents lots, d'un kit à un autre, pourrait affecter de façon négative les résultats attendus et la validité du test dans son ensemble. De telles modifications ou échanges invalident toute réclamation pour remplacement.

Toutes les réclamations soumises, relatives au paragraphe 11.2, et dues à une mauvaise interprétation des résultats de laboratoire de la part du client sont également invalides. Néanmoins, en cas de réclamation, la responsabilité du fabricant n'est pas de dépasser les limites de la valeur du kit. Tout dommage causé au kit lors de son transport n'est pas du ressort de la responsabilité du fabricant.







## 12 REFERENCES

Voir le manuel de l'utilisateur en version anglaise.

## SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISA 'S

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



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