

Instructions for Use

β -HCG ELISA

IVD



REF EIA-1911



96



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

Distributed by:



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

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos / Table des matières

1	INTENDED USE.....	2	1	FINALIDAD PREVISTA.....	24
2	PRINCIPLE OF THE TEST	2	2	FUNDAMENTO DEL ENSAYO	24
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	3	3	PRECAUCIONES	24
4	REAGENTS.....	4	4	COMPONENTES DEL KIT.....	25
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	5	5	MUESTRAS	26
6	ASSAY PROCEDURE.....	5	6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	26
7	EXPECTED NORMAL VALUES.....	7	7	VALORES ESPERADOS	28
8	QUALITY CONTROL.....	7	8	CONTROL DE CALIDAD	28
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	8	9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO.....	29
10	LIMITATIONS OF USE.....	9	10	LIMITACIONES DE USO	29
11	LEGAL ASPECTS	9	11	ASPECTOS LEGALES	30
12	REFERENCES / LITERATURE.....	9	12	REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA.....	30
1	ZWECKBESTIMMUNG	10	1	UTILISATION PRÉVUE	31
2	TESTPRINZIP	10	2	PRINCIPE DU TEST	31
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	11	3	PRECAUTIONS D'UTILISATION	31
4	BESTANDTEILE DES KITS	12	4	RÉACTIFS	32
5	PROBENVORBEREITUNG.....	13	5	ECHANTILLON	33
6	TESTDURCHFÜHRUNG	13	6	RÉALISATION DU TEST	33
7	ERWARTETE WERTE	15	7	VALEURS ATTENDUES.....	35
8	QUALITÄTSKONTROLLE.....	15	8	CONTROLE DE QUALITE	35
9	ASSAY-CHARAKTERISTIKA.....	16	9	CARACTERISTIQUES DU TEST	36
10	GRENZEN DES TESTS	16	10	LIMITES D'UTILISATION.....	36
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	17	11	ASPECTS LEGAUX.....	37
12	REFERENZEN / LITERATUR	17	12	REFERENCES / BIBLIOGRAPHIE	37
1	DESTINAZIONE D'USO	18		SYMBOLS USED.....	38
2	PRINCIPIO DEL TEST	18			
3	PRECAUZIONI.....	18			
4	COMPONENTI DEL KIT.....	19			
5	CAMPIONI.....	20			
6	ATTUAZIONE DEL TEST.....	20			
7	VALORI NORMALI.....	22			
8	CONTROLLO QUALITÀ.....	22			
9	CARATTERISTICHE DEL TEST	22			
10	LIMITAZIONE DEL TEST	23			
11	ASPETTI LEGALI	23			
12	BIBLIOGRAFIA.....	23			

1 INTENDED USE

The **DRG β -HCG ELISA Kit** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro* diagnostic measurement of total human chorionic gonadotropin (hCG and β -hCG) in serum.

This kit is NOT intended to be used for the risk evaluation of trisomy 21.

1.1 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. 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 β -hCG/hCG molecule are essential for differentiation between hCG and LH, FSH and TSH.

Specific assays for beta-hCG permit the early detection of pregnancy.

In addition to the elevated hCG levels during pregnancy, high concentrations of β hCG/hCG may be associated with neoplasms of trophoblastic and nontrophoblastic origin such as hydatiform mole, chorionepithelioma, embryonal cell carcinoma, seminoma and many others.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

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

The microtiter wells are coated with a monoclonal antibody [mouse] directed towards a unique antigenic site on a β -HCG molecule. An aliquot of patient sample containing endogenous β -HCG and/or HCG is incubated in the coated well with enzyme conjugate, which is an anti- β -HCG antibody conjugated with horseradish peroxidase. After incubation the unbound conjugate is washed off.

The amount of bound peroxidase is proportional to the concentration of β -HCG/HCG in the sample.

Having added the substrate solution, the intensity of colour developed is proportional to the concentration of β -HCG/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 instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C 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 microtiter plate 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 H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DRG.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with anti-β-HCG antibody (monoclonal).
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 vials (lyophilized), 1 mL;
Concentrations: 0, 5; 25; 50; 100; 200 mIU/mL
Conversion: 1 pg/mL = 0.00916 mIU/mL
The standards are calibrated against the following reference material: 5th WHO International Standard Chorionic Gonadotrophin, NIBSC code: 07/364.
See „Preparation of Reagents“;
Contain non-mercury preservative.
3. **Sample Diluent**, 1 vial, 10 mL, ready to use,
Contains non-mercury preservative.
4. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 11 mL, ready to use,
Anti-β-HCG antibody conjugated to horseradish peroxidase;
Contains non-mercury preservative.
5. **Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
Tetramethylbenzidine (TMB).
6. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
contains 0.5 M H₂SO₄,
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.

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

4.2 Materials required but not provided

- A calibrated microtiter plate reader (450 nm, with reference wavelength at 620 nm to 630 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes
- Absorbent paper
- Distilled water
- Timer
- 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.

Opened kits retain activity for 8 weeks if stored as described above.

4.4 Reagent Preparation

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

Standards

Reconstitute the lyophilized contents of each vial with 1 ml distilled water and let stand for at least 10 minutes at room temperature. Mix several times before use.

Note: *The reconstituted standards are stable for 2 months at 2 °C - 8 °C.
For longer storage aliquot and 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 Safety Data Sheet, section 13.

4.6 Damaged Test Kits

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

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum should be used in this assay.

Note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

In general, it should be avoided to use haemolytic, icteric, or lipaemic specimens. For further information refer to chapter “*Interfering Substances*”.

5.1 Specimen Collection

Serum:

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

5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 7 days at 2 °C - 8 °C prior to assaying.

Specimens held for a longer time (up to 12 months) 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).
- c) dilution 1:1000 10 µL dilution b) 1:100 + 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.

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 **60 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 **15 minutes** at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **50 µL of Stop Solution** to each well.
9. Determine the optical density of the solution in each well at **450 nm (reading) and at 620 - 630 nm (background subtraction, recommended)** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Calculation of Results (quantitative)

1. Calculate the average optical density (OD) values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using linear graph paper, construct a standard curve by plotting the mean OD obtained from each standard against its concentration with OD value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean OD value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4-Parameter curve fit. (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as > 200 mIU/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

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

Standard	Optical Density (450 nm)
Standard 0 (0 mIU/mL)	0.04
Standard 1 (5 mIU/mL)	0.15
Standard 2 (25 mIU/mL)	0.28
Standard 3 (50 mIU/mL)	0.53
Standard 4 (100 mIU/mL)	0.94
Standard 5 (200 mIU/mL)	1.50

6.4 Assay Procedure (qualitative method)

This procedure differentiates positive (pregnant) from negative samples by comparing the sample beta hCG levels with the *Standard 0* (0 mIU/mL) and *Standard 3* (50 mIU/mL).

Patient samples are run with the Standard 0 and the 50 mIU/mL Standard. The assay procedure is identical with the Quantitative Method, but step 9 and 10 is omitted.

6.5 Calculation of Results (qualitative)

For a qualitative analysis of the β-hCG level the color development of the specimen is compared with the color of the 0 mIU/mL and 50 mIU/mL standards.

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.

7.1 Normal healthy adults, non-pregnant

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

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

7.2 Pregnant women in the 2nd trimester

Week of pregnancy	Valid samples	5% Percentile [mIU/mL]	95% Percentile [mIU/mL]
14	103	10 303	71 980
15	96	9 246	51 666
16	91	5 266	36 947
17	14	4 632	24 033

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 medications and diseases such as rheumatoid arthritis. In such cases, the interpretation of the pregnancy test should be done carefully.

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

8 QUALITY CONTROL

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

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

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

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

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

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.44 – 200 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 β-HCG in serum (mIU/mL)
hLH	300 mIU/mL	6
hLH	200 mIU/mL	< 5
hLH	80 mIU/mL	< 5
TSH	75 µIU/mL	8
TSH	50 µIU/mL	< 5
TSH	25 µIU/mL	< 5
FSH	200 mIU/mL	< 5
FSH	50 mIU/mL	< 5

9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity was calculated from the mean plus two standard deviations of twenty (20) replicate analyses of the Standard 0 and was found to be 0.44 mIU/mL.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra Assay Variation

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (mIU/mL)	CV (%)
1	20	5.9	9.4
2	20	18.6	4.0
3	20	147.9	3.5

9.4.2 Inter Assay Variation

The between assay variability is shown below:

Sample	Mean (mIU/mL)	CV (%)
1	5.6	9.9
2	17.1	7.2
3	140.0	6.9

9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding β-HCG solutions with known concentrations.

The recovery (%) was calculated by multiplying the ratio of measured and expected values with 100.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration (mIU/mL)	30.9	69.0	115.2
Average Recovery (%)	94.4	91.3	90.7
Range of Recovery (%)	from	91.3	88.6
	to	99.3	94.2

9.6 Linearity

Samples were measured undiluted and in serial dilutions with standard 0. The recovery (%) was calculated by multiplying the ratio of expected and measured values with 100.

		Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration (mIU/mL)		39.7	75.6	128.4
Average Recovery (%)		102.0	95.5	96.8
Range of Recovery (%)	from	90.9	86.2	92.9
	to	115.0	109.3	101.3

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 β -HCG in a sample.

10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test up to 15 800 mIU/mL of β -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 DRG.

11.2 Therapeutic Consequences

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

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

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

11.3 Liability

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

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2 are also invalid.

Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

12 REFERENCES / LITERATURE

1. Sancken, U., Bartels, I., Der sogenannte Triple-Test. Reproduktionsmedizin 15:276-284, 1999
2. Cole L.A. Clinical Chemistry 43:12, 2233-2243, 1997
3. Iles R.K., Javid M.K., Gunn L.K., Chard T. Clinical Chemistry 45:4, 532-538, 1999
4. Iles R.K., Javid M.K., Gunn L.K., Chard T. Clinical Chemistry 40:3, 484-485, 1994
5. Korhonen J., Alfthan H., Ylöstalo P., Veldhuis J., Stenman U.-H. Clinical Chemistry 43:11, 2155-2163, 1997

1 ZWECKBESTIMMUNG

Der **DRG β-HCG ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung des Gesamt-HCG (HCG und β-HCG) in Serum eingesetzt. Nur für in-vitro Diagnostik.

Dieser Kit ist NICHT für die Risikobewertung von Trisomie 21 vorgesehen.

2 TESTPRINZIP

Der DRG **β-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 β-HCG -Moleküls gerichtet ist.

Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und mit einem Enzymkonjugat inkubiert. Das Konjugat enthält einen anti-β-HCG-Antikörper, der mit Meerrettichperoxidase konjugiert ist. 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/β-HCG-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Dieser Kit ist nur zum *in vitro* diagnostischen Gebrauch geeignet. Nur für den professionellen Gebrauch.
2. Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden durch von der FDA zugelassene Verfahren auf HIV I/II, HBsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Alle Reagenzien sollten jedoch im Gebrauch und bei der Entsorgung als potentielle biologische Gefahrenstoffe behandelt werden.
3. Vor Beginn des Tests ist die Gebrauchsanweisung vollständig und sorgfältig zu lesen. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung. Stellen Sie sicher, dass alles verstanden wurde.
4. Die Mikrotiterplatte besteht aus einzeln herausnehmbaren und abbrechbaren Streifen. Ungenutzte Vertiefungen müssen bei 2 °C bis 8 °C im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
5. Das Pipettieren der Proben und Reagenzien muss so schnell wie möglich und für jeden Schritt in der gleichen Reihenfolge erfolgen.
6. Behältnisse jeweils nur für ein einziges Reagenz verwenden. Dies gilt insbesondere für die Substrat-Behälter. Die Verwendung eines Behälters zum Pipettieren der Substratlösung, der zuvor für die Konjugatlösung verwendet wurde, kann zu einer Verfärbung der Lösung führen. Gießen Sie keine Reagenzien zurück in die originalen Fläschchen, da es zu einer Kontamination der Reagenzien kommen kann.
7. Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatten-Vertiefungen gründlich, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten-Vertiefungen nicht wiederverwenden.
8. Kavitäten während des Assays nicht trocknen lassen; Reagenzien unmittelbar nach Ende des Waschschriffs hinzufügen.
9. Lassen Sie die Reagenzien vor Testbeginn Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) erreichen. Die Temperatur wirkt sich auf die Messungen der optischen Dichte des Assays aus. Die Werte für die Patientenproben werden jedoch nicht beeinflusst.
10. Niemals mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
11. In Bereichen, in denen Proben oder Kit-Reagenzien verwendet werden, darf nicht geraucht, gegessen, getrunken oder Kosmetika aufgetragen werden.
12. Beim Umgang mit Proben und Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Eine mikrobielle Kontamination von Reagenzien oder Proben kann zu falschen Ergebnissen führen.
13. Die Handhabung sollte in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, die in einer entsprechenden nationalen Richtlinie oder Vorschrift zur Biogefährdung definiert sind.
14. Reagenzien nicht über das auf den Kit-Etiketten angegebene Verfallsdatum hinaus verwenden.
15. Alle im Kit-Protokoll angegebenen Volumina müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
16. Komponenten aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern dürfen nicht gemischt oder zusammen verwendet werden. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zusammen zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um die gleiche Charge handelt. Die Kits können unter unterschiedlichen Bedingungen versandt oder gelagert worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
17. Kontakt mit der Stopplösung (*Stop Solution*) sollte vermieden werden, da sie 0,5 M H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
18. Einige Reagenzien enthalten ProClin 300, BND und/oder MIT als Konservierungsmittel. Bei Kontakt mit Augen oder Haut sofort mit Wasser spülen.
19. TMB-Substrat hat eine reizende Wirkung auf Haut und Schleimhäute. Bei möglichem Kontakt Augen mit reichlich Wasser und Haut mit Seife und reichlich Wasser spülen. Kontaminierte Gegenstände vor der Wiederverwendung waschen. Falls eingeatmet, die Person an die frische Luft bringen.
20. Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen
21. Informationen zu den im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DRG Instruments GmbH erhältlich.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar), mit anti-β-hCG-Antikörper (monoklonal) beschichtet.
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 Fläschchen (lyophilisiert), je 1,0 mL
Konzentrationen: 0, 5; 25; 50; 100; 200 mIU/mL
Umrechnungsfaktor: 1 pg/mL = 0,00916 mIU/mL
Die Standards sind gegen das folgende Referenzmaterial kalibriert: 5. WHO Internationaler Standard Chorionic Gonadotrophin, NIBSC code: 07/364.
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **Sample Diluent** (Probenverdünnungsmedium), 1 Fläschchen, 10 mL, gebrauchsfertig
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 11 mL, gebrauchsfertig
Anti-hCG-Antiserum mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig
Substratlösung TMB
6. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig
enthält 0,5 M H₂SO₄
Kontakt mit der Stop Solution vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.

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

4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit (450 nm, mit Referenzwellenlänge bei 620 nm bis 630 nm)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser
- Laborwecker
- Millimeterpapier oder Software zur Datenauswertung

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. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits 8 Wochen ihre Reaktivität.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

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

Standards

Das Lyophilisat in jedem Fläschchen mit 1,0 mL destilliertem Wasser auflösen und mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Vor der Verwendung mehrere Male mischen.

Achtung: *Bei 2 °C - 8 °C sind die rekonstituierten Standards 2 Monate haltbar.
Für eine längere Aufbewahrung aliquotieren und 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 Sicherheitsdatenblatt, Abschnitt 13.

4.6 Beschädigte Testkits

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

5 PROBENVORBEREITUNG

Serum sollte in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

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

Generell sollte die Verwendung von hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben vermieden werden. Weitere Informationen finden Sie im Kapitel „*Interferenzen*“.

5.1 Probenentnahme

Serum:

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

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 7 Tage bei 2 °C - 8 °C gelagert werden. Für eine längere Aufbewahrung (bis zu 12 Monate) 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).
- c) Verdünnung 1:1000: 10 µL Verdünnung b) 1:100 + 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 durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

6.2 Testdurchführung (quantitative Methode)

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

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. **60 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 5-mal 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 Waschschrittes!
6. **100 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
7. **15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
9. Die Optische Dichte (OD) bei **450 nm (Messung) und 620 - 630 nm (Abzug des Hintergrundes, empfohlen)** mit einem Mikrotiterplattenleser innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der *Stop Solution* bestimmen.

6.3 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 Gebrauchsanweisung angegebenen Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter-Gleichung bestimmt. (4 Parameter Rodbard oder 4 Parameter Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

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

Standard	Optische Dichte (450nm)
Standard 0 (0 mIU/mL)	0,04
Standard 1 (5 mIU/mL)	0,15
Standard 2 (25 mIU/mL)	0,28
Standard 3 (50 mIU/mL)	0,53
Standard 4 (100 mIU/mL)	0,94
Standard 5 (200 mIU/mL)	1,50

6.4 Testdurchführung (Qualitative Methode)

Dieses Verfahren ermöglicht die Unterscheidung zwischen positiven (Schwangerschaftsnachweis) und negativen Proben durch Vergleich der Patientenproben mit *Standard 0* (0 mIU/mL) und dem *Standard 3* mit 50 mIU/mL).

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

6.5 Qualitative Ergebnisse

Für die qualitative Auswertung wird die Farbintensität der Probe mit der Farbintensität des *Standard 0* und des *Standard 3* (50 mIU/mL) verglichen.

Ist die Farbintensität der Probe geringer als die des *Standard 3* mit 50 mIU/mL, ist die Probe als negativ zu betrachten. Ist die Farbintensität der Probe gleich oder stärker als die des *Standard 3* 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 DRG β-HCG ELISA folgende Werte:

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

7.2 Schwangere Frauen im 2. Trimester

Schwangerschafts- woche	N	5% Perzentile [mIU/mL]	95% Perzentile [mIU/mL]
14	103	10 303	71 980
15	96	9 246	51 666
16	91	5 266	36 947
17	14	4 632	24 033

ACHTUNG:

1. 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.
2. 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.

Die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für therapeutische Konsequenzen dienen. Die Ergebnisse müssen zusammen mit anderen klinischen Befunden und diagnostischen Tests des Patienten interpretiert werden.

8 QUALITÄTSKONTROLLE

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 DRG in Verbindung.

9 ASSAY-CHARAKTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,44 – 200 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 *Standards 0* (n = 20), beträgt 0,44 mIU/mL.

Die Daten zu:

9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

10 GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit vollständigem Verständnis der Anweisungen in der Gebrauchsanleitung und unter Befolgung der GLP (Good Laboratory Practice)-Richtlinien durchgeführt wird.

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikation 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 β-HCG-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook Effekt tritt bei Proben mit bis zu 15 800 mIU/mL β-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 DRG in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

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

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

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

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

12 REFERENZEN / LITERATUR

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

1 DESTINAZIONE D'USO

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

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

Questo kit NON è inteso per essere utilizzato per la valutazione del rischio di trisomia 21.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test kit DRG β -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 β -HCG. Un'aliquota di un campione di paziente contenente HCG/ β -HCG endogeno viene incubato nel pozzetto ricoperto dell'enzima coniugato, che è un anticorpo anti- β -HCG monoclonale 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/ β -HCG nel campione.

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

3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.
- Informazioni su sostanze pericolose contenute nel kit sono riportate nel regolamento di sicurezza.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la *Stop Solution* dovrebbe essere evitato perché contiene 0,5 M H₂SO₄. 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 immagazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta DRG Instruments GmbH.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

1. **Microtiterwells** (Micropozzetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti;
Pozzetti ricoperti con l'anti-β-HCG anticorpo (monoclonale)
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 flaconi (liofilizzati), 1,0 mL;
Concentrazione: 0, 5; 25; 50; 100; 200 mIU/mL
Conversione: 1 pg/mL = 0,00916 mIU/mL
Gli standard sono standardizzati contro il seguente materiale di riferimento: 5th WHO International Standard Chorionic Gonadotrophin, NIBSC code: 07/364.
Vedi "preparazione dei reagenti".
Contiene conservante senza mercurio.
3. **Sample Diluent** (Diluyente dei campioni), 1 flacone, 10 mL, pronto all'uso
Contiene conservante senza mercurio.
4. **Enzyme Conjugate** (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 11 mL, pronto all'uso
Anti- β-HCG anticorpo coniugato alla perossidasi di rafano
Contiene conservante senza mercurio.
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 0,5 M H₂SO₄.
Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.

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

4.2 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450 nm, con lunghezza d'onda di riferimento a 620 nm a 630 nm)
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile
- Carta assorbente
- Acqua distillata
- Timer
- Carta millimetrata o software per il calcolo dei dati

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 8 settimane se magazzinati alle condizioni sopra descritte.

4.4 Preparazione dei reagenti

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

Standards

Ricostituire il contenuto liofilizzato di ogni flacone con 1,0 mL acqua distillata e lasciare per almeno 10 minuti a temperatura ambiente. Mescolare alcune volte prima dell'uso.

Nota: *Gli standard ricostituiti sono stabili per 2 mesi a 2 °C - 8 °C.*

Per una conservazione più lunga i standard ricostituiti devono essere aliquotati e conservati 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 DRG, al più tardi una settimana dopo il ricevimento del kit. Componenti danneggiati non dovrebbero essere utilizzati per il test. Questi componenti devono essere magazzinati fino alla soluzione del problema. Dopo di che essi devono essere smaltiti secondo le norme ufficiali.

5 CAMPIONI

Siero può essere usato per questo test.

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

In generale si dovrebbe evitare l'uso di campioni emolitici, itterici o lipemici. Per ulteriori informazioni consultare il capitolo "Sostanze interferenti".

5.1 Collezione dei campioni

Siero:

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

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

5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere magazzinati ben chiusi fino a 7 giorni a 2 °C - 8 °C.

Campioni magazzinati per un periodo più lungo (fino a 12 mesi) 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) 1:10 + 90 µL *Sample Diluent* (agitare bene).
- c) diluizione 1:1000: 10 µL della diluizione b) 1:100 + 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.

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 **60 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 **15 minuti** a temperatura ambiente.
8. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **50 µL** della **Stop Solution** ad ogni pozzetto.
9. Determinare la densità ottica (DO) della soluzione in ogni pozzetto **a 450 nm (lettura) e a 620 - 630 nm (sottrazione dello sfondo, raccomandata)** con un lettore di piastre di microtitolazione.
Si raccomanda di leggere i pozzetti entro 10 minuti dall'aggiunta della **Stop Solution**.

6.3 Rilevamento dei risultati (quantitativo)

1. Determinare i valori medi della densità ottica (DO) per ogni set di standard, controlli e campioni.
2. Costruire una curva standard: riportare i valori medi della densità ottica (DO) di ogni standard contro la rispettiva concentrazione dove i valori delle DO si devono trovare sull'asse verticale (Y) e le concentrazioni sull'asse orizzontale (X).
3. Utilizzando il valore medio delle DO per ogni campione si determina la rispettiva concentrazione dalla curva standard.
4. Metodo automatico: I valori riportati in queste istruzioni per l'uso sono stati determinati tramite l'equazione a 4 parametri. (I metodi preferiti sono 4 Parameter Rodbard oppure 4 Parameter Marquardt.) Altri funzioni usati per l'elaborazione dei dati possono dare risultati leggermente differenti.
5. La concentrazione dei campioni può essere determinata direttamente dalla curva standard. 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.

6.3.1 Esempio di una curva standard tipica

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 0 (0 mIU/mL)	0,04
Standard 1 (5 mIU/mL)	0,15
Standard 2 (25 mIU/mL)	0,28
Standard 3 (50 mIU/mL)	0,53
Standard 4 (100 mIU/mL)	0,94
Standard 5 (200 mIU/mL)	1,50

6.4 Esecuzione del test (metodo qualitativo)

Questo procedimento distingue campioni positivi (gravidanza) da campioni negativi comparando i livelli β-hCG con quelli del *Standard 0* (0 mIU/mL) e dello *Standard 3* (50 mIU/mL).

I campioni dei pazienti vanno analizzati assieme al *Standard 0* (0 mIU/mL) e allo *Standard 3* (50 mIU/mL).

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

6.5 Risultati qualitativi

Per una analisi qualitativa dei livelli hCG/β-hCG lo sviluppo del colore dei campioni è paragonato a quello del *Standard 0* (0 mIU/mL) e dello *Standard 3* (50 mIU/mL).

Se il colore blu è meno intenso di quello dello *Standard 3* (50 mIU/mL), il campione è da considerare negativo.

Se il colore blu è più intenso o uguale a quello dello *Standard 3* (50 mIU/mL), il campione è 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 DRG β-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 Donne incinte nel 2° trimestre

Settimana di gravidanza	N	5% Percentile [mIU/mL]	95% Percentile [mIU/mL]
14	103	10 303	71 980
15	96	9 246	51 666
16	91	5 266	36 947
17	14	4 632	24 033

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 più 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.

Come per tutti i test diagnostici, una diagnosi clinica definitiva **non** dovrebbe basarsi sui risultati di un singolo dosaggio. Una diagnosi clinica dovrebbe essere formulata dal medico in seguito ad un'attenta valutazione di tutti gli aspetti clinici assieme ai dati di laboratorio.

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 magazzinaggio e d'incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio.

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

9 CARATTERISTICHE DEL TEST

9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 0,44 – 200 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 *Standard 0* ed erano 0,44 mIU/mL.

Dati dettagliati su

9.4 Precisione

9.5 Recupero

9.6 Linearità

si prega di consultare le dettagliate istruzioni per l'uso in inglese.

10 LIMITAZIONE DEL TEST

Risultati affidabili e riproducibili saranno ottenuti quando il procedimento del test è seguito con una comprensione completa delle istruzioni all'uso e seguendo una buona pratica di laboratorio (GLP).

Ogni manutenzione impropria dei campioni o modificazione al saggio 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 β-HCG nel campione.

10.3 Effetto Hook di alti dosaggi

Nessun effetto hook (di agglomerazione) è stato osservato in questo test fino a 15 800 mIU/mL di β-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 DRG.

11.2 Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente.

Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche.

Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

11.3 Responsabilità legali

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

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

12 BIBLIOGRAFIA

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

1 FINALIDAD PREVISTA

El **Kit de inmunoensayo enzimático DRG β -HCG ELISA** proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del Gonadotropina coriónica (HCG + β -HCG) en suero.

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

Este kit NO está diseñado para ser utilizado para la evaluación del riesgo de trisomía 21.

2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit DRG β -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/policlonal dirigido contra un único foci antigénico en una molécula de β -HCG. Se incubaba una alícuota de una muestra perteneciente a un paciente que contiene HCG/ β -HCG endógena en los pocillos recubiertos con el enzima conjugado, que es un anticuerpo anti- β -HCG 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/ β -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/ β -HCG en la muestra del paciente.

3 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*.
- Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
- Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
- Evitar contacto con *Stop Solution* que contiene H₂SO₄ 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 DRG Instruments GmbH.

4 COMPONENTES DEL KIT

4.1 Componentes del Kit

1. **Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12 x 8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti-β-HCG (monoclonal).
2. **Standard (Standard 0-5)**, (Estándar), 6 viales (liofilizados), 1,0 mL; Concentraciones: 0, 5; 25; 50; 100; 200 mIU/mL
Conversión: 1pg/mL = 0,00916 mIU/mL
Los estándares están calibrado contra el siguiente material de referencia: 5th WHO International Standard Chorionic Gonadotrophin, NIBSC code: 07/364.
Contiene conservante sin mercurio.
3. **Sample Diluent** (Solución para dilución de la muestra), 1 vial, 10 mL, listo para usar, Contiene conservante sin mercurio.
4. **Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático), 1 vial, 11 mL, listo para usar, Anticuerpo anti- β-HCG conjugado con la Peroxidasa de rábano; Contiene conservante sin mercurio.
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 0.5 M H₂SO₄, Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en al piel.

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, con longitud de onda de referencia a 620 nm a 630 nm)
- Micropipetas de precisión variable calibradas
- Papel absorbente
- Agua destilada
- Temporizador
- Papel cuadriculado o software para el cálculo de datos

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 8 semanas 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

Reconstituya el contenido liofilizado de cada tubo con 1,0 mL de agua destilada y espere al menos 10 minutos a temperatura ambiente. Mezcle varias veces antes de usar.

Nota: Los estándares reconstituidos son estables durante 2 meses a 2 °C - 8 °C.
Para períodos más largos alícuotas y 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 DRG, no mas 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.

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

En general, se debe evitar el uso de muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas. Para más información consulte el capítulo "*Sustancias que pueden interferir*".

5.1 Toma de muestras

Suero:

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

5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 7 días a 2 °C - 8 °C antes del ensayo.

Las muestras almacenadas por un período de tiempo mas largo (hasta 12 meses) 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 mas 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).
- c) dilución 1:1000: 10 µL dilución b) 1:100 + 90 µL *Sample Diluent* (mezclar totalmente).

NOTA:

El suero de las mujeres embarazadas debe diluirse 1/100 en el diluyente de las muestras (*Sample Diluent*) 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 densidad óptica 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 (cuantitativo)

Cada uno debe incluir una curva de estándares.

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 **60 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 **15 minutos** a temperatura ambiente.
8. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **50 µL** de **Stop Solution** a cada pocillo.
9. Determinar la densidad óptica (DO) de la solución en cada pocillo a **450 nm (lectura) y a 620 - 630 nm (se recomienda la sustracción de fondo)** con un lector de microplacas.
Se recomienda que los pocillos se lean dentro de los 10 minutos siguientes a la adición de la solución de parada.

6.3 Cálculo de los Resultados (cuantitativo)

1. Calcular los valores de densidad óptica (DO) promedio para cada conjunto de estándares, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar mediante la representación de la densidad óptica media obtenida para cada estándar frente a su concentración con el valor de DO en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de la DO media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en las instrucciones de uso se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 Parámetros. (4 Parámetros Rodbard o 4 Parámetros Marquardt son los métodos preferidos.) Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de las muestras 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.

6.3.1 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	Densidad óptica (450 nm)
Standard 0 (0 mIU/mL)	0,04
Standard 1 (5 mIU/mL)	0,15
Standard 2 (25 mIU/mL)	0,28
Standard 3 (50 mIU/mL)	0,53
Standard 4 (100 mIU/mL)	0,94
Standard 5 (200 mIU/mL)	1,50

6.4 Procedimiento de ensayo (Método cualitativo)

Este procedimiento diferencia entre muestras positivas (embarazada) y negativas mediante la comparación de los niveles de β-hCG de la muestra con el Standard 0 (0 mIU/mL) y el estándar 3 (50 mIU/mL).

Las muestras de los pacientes son analizadas con los estándares 0 mIU/mL y 50 mIU/mL (*Standard 0* y *Standard 3*). El procedimiento de ensayo es idéntico con el Método cuantitativo, pero se omiten los pasos 9 y 10.

6.5 Cálculo de los Resultados (cualitativo)

Para un análisis cualitativo de los niveles de β-hCG el desarrollo del color de la muestra se compara con el color del diluyente de estándar 0 (0 mIU/mL) y del estándar 3 (50 mIU/mL).

Si el color azul es menos intenso que el color del estándar 3 (50 mIU/mL) la muestra se considera negativa.

Si el color azul es mas intenso que el color del estándar 3 (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 sanos normales, no embarazados

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

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

7.2 Mujeres embarazadas en el segundo trimestre

Week of pregnancy	N válido	5% Percentil [mIU/mL]	95% Percentil [mIU/mL]
14	103	10 303	71 980
15	96	9 246	51 666
16	91	5 266	36 947
17	14	4 632	24 033

Atención:

- 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 medications and diseases such as rheumatoid arthritis. In such cases, the interpretation of the pregnancy test should be done carefully.

Los resultados obtenidos no deberían ser el único motivo para una intervención terapéutica. Los resultados han de correlacionarse con otras observaciones clínicas y tests de diagnóstico.

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 arriba mencionado sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DRG directamente.

9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 0,44 – 200 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 *Estándar 0* y resultó ser 0,44 mIU/mL.

Para información sobre

9.4 Precisión

9.5 Recuperación

9.6 Linealidad

por favor consulte la versión detallada en inglés de las Instrucciones de Uso.

10 LIMITACIONES DE USO

Únicamente se obtendrán resultados fiables y reproducibles, cuando el procedimiento del ensayo se realice entendiendo las instrucciones de uso correctamente y desarrollando buenas prácticas de laboratorio.

Cualquier manejo impropio de las muestras o modificación del test puede 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 β-HCG en una muestra.

10.3 Efecto Gancho-Dosis-Elevada

No se ha observado efecto gancho en este ensayo hasta 15 800 mIU/mL de β-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 DRG.

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 / BIBLIOGRAFÍA

Consultar el manual de usuario en inglés.

1 UTILISATION PRÉVUE

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

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

Ce kit n'est PAS destiné à être utilisé pour l'évaluation du risque de trisomie 21.

2 PRINCIPE DU TEST

Le kit DRG β-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 β-HCG.

Un aliquot de l'échantillon contenant HCG/β-HCG endogène est incubé dans un puits avec l'enzyme conjuguée, c'est-à-dire un anticorps anti-β-HCG 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/β-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/β-HCG contenu(e) dans l'échantillon.

3 PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Ce kit est uniquement destiné aux tests diagnostiques *in vitro*.
- Utilisez uniquement la version valide d'instructions d'utilisation qui est incluse dans le kit.
- Les informations concernant la toxicité des réactifs contenus dans ce kit sont présentées dans la fiche de sécurité (« 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 H₂SO₄. 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 DRG Instruments GmbH.

4 RÉACTIFS

4.1 Réactifs fournis

1. **Microtiterwells (Microplaques)**, 12 x 8 (à détacher) barrettes, plaques de 96 puits; Les puits sont recouverts avec un anticorps anti-β-HCG (monoclonal).
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 flacons (lyophilisés), 1,0 mL; Concentrations: 0, 5; 25; 50; 100; 200 mIU/mL
Conversion: 1 pg/mL = 0,00916 mIU/mL
Les standards sont étalonnés contre la matériel de référence suivante: 5th WHO International Standard Chorionic Gonadotrophin, NIBSC code: 07/364.
Voir « Préparation des réactifs » ;
Contient agent de conservation sans mercure.
3. **Sample Diluent (Solution pour dilution de l'échantillon)**, 1 flacon, 10 mL, prêt à l'emploi, Contient agent de conservation sans mercure.
4. **Enzyme Conjugate (Conjugué enzymatique)**, 1 flacon, 11 mL, prêt à l'emploi, Anticorps anti- β-HCG conjugué à la HRP; Contient agent de conservation sans mercure.
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 0.5 M de H₂SO₄,
Eviter les contacts avec la solution stop. Cela pourrait engendrer irritations ou brûlures de la peau.

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 microplaques calibré (450 nm, avec longueur d'onde de référence à 620 nm à 630 nm)
- Des micro-pipettes de précision variables et calibrées
- Du papier absorbant
- Eau distillée
- Un minuteur
- Papier graphique ou logiciel pour la réduction des données

4.3 Stockage et stabilité du kit

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

Les kits ouverts conservent leur activité durant 8 semaines 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 de chaque flacon avec 1,0 mL d'eau distillée et attendre au moins 10 minutes à température ambiante. Mélanger plusieurs fois avant utilisation.

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

Pour un stockage prolongé, aliquoter et 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 DRG, 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

Le sérum doit être utilisé dans ce test

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

En général, il faut éviter d'utiliser des échantillons hémolytiques, ictériques ou lipémiques. Pour plus d'informations, se reporter au chapitre "*Substances interférentes*".

5.1 Prélèvement et préparation des échantillons

Sérum:

Prélever le sang par ponction veineuse (ex. Sarstedt Monovette pour sérum), 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.

5.2 Conservation des échantillons

Les tubes contenant les échantillons doivent être fermés et peuvent être stockés jusqu'à 7 jours à 2 °C - 8 °C avant d'être testés.

Les échantillons stockés pour un temps prolongé (jusqu'à 12 mois) 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).
- b) dilution 1:1000: 10 µL dilution b) 1:100 + 90 µL *Sample Diluent* (bien mélanger).

Remarque:

Les sérums de femmes enceintes doivent être dilués au 1/100 dans la solution pour dilution de l'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 nouvel embout de pipette pour chaque standard, contrôle ou échantillon, ceci afin d'éviter toute contamination.
- La densité optique 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 (quantitative)

Chaque test doit inclure une courbe étalon.

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 **60 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 **15 minutes** à température ambiante.
8. Stopper la réaction enzymatique en ajoutant **50 µL** de *Stop Solution* à chaque puits.
9. Déterminer la densité optique (DO) de la solution dans chaque puits à **450 nm (lecture) et à 620 - 630 nm (soustraction de fond, recommandée)** à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques.
Il est recommandé de lire les puits dans les 10 minutes qui suivent l'ajout de la solution d'arrêt.

6.3 Calcul des résultats (quantitative)

1. Calculer les valeurs moyennes des densités optiques (DO) 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 les instructions d'utilisation ont été calculés de façon automatique en utilisant une courbe de régression 4 Paramètres. (4 paramètres Rodbard ou 4 paramètres Marquardt sont les méthodes favorites.) 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.

6.3.1 Exemple d'une courbe standard typique

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

Standard	Densité optique (450 nm)
Standard 0 (0 mIU/mL)	0,04
Standard 1 (5 mIU/mL)	0,15
Standard 2 (25 mIU/mL)	0,28
Standard 3 (50 mIU/mL)	0,53
Standard 4 (100 mIU/mL)	0,94
Standard 5 (200 mIU/mL)	1,50

6.4 Réalisation du dosage (qualitative)

Les échantillons sont analysés avec les standards 0 mIU/ml, et 50 mIU/ml (*Standard 0* et *Standard 3*). La méthode est exactement la même que la méthode quantitative, mais les étapes 9 et 10 sont omises.

Voir le manuel de l'utilisateur en version anglaise.

6.5 Calcul des résultats (qualitative)

Pour une analyse qualitative du niveau de β-HCG, la coloration de l'échantillon est comparée avec la coloration des *Standard 0* et *Standard 3*.

Voir le manuel de l'utilisateur en version anglaise.

7 VALEURS ATTENDUES

Il est fortement recommandé à chaque laboratoire de déterminer ses propres valeurs normales et pathologiques.

7.1 Adultes normaux sains, non enceintes

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

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

7.2 Femmes enceintes au 2ème trimestre

Semaine de la grossesse	Valid N	5% Pourcentage [mIU/mL]	95% Pourcentage [mIU/mL]
14	103	10 303	71 980
15	96	9 246	51 666
16	91	5 266	36 947
17	14	4 632	24 033

ATTENTION:

- 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 medications and diseases such as rheumatoid arthritis. In such cases, the interpretation of the pregnancy test should be done carefully.

Les résultats ne doivent pas être utilisés seuls pour déterminer les décisions thérapeutiques. Ils doivent être corrélés avec d'autres observations cliniques et tests diagnostiques.

8 CONTROLE DE QUALITE

Il est recommandé d'utiliser les échantillons contrôles selon les réglementations nationales en vigueur. L'utilisation des échantillons contrôles est recommandé 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 pipettage 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 DRG.

9 CARACTERISTIQUES DU TEST

9.1 Zone de mesure

Les limites du dosage sont comprises entre 0,44 – 200 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 *Standard 0* et a été mesurée à 0,44 mIU/mL.

Pour

9.4 Précision

9.5 Récupération

9.6 Linéarité

consulter la version anglaise détaillée du mode d'emploi.

10 LIMITES D'UTILISATION

Les résultats seront fiables et reproductibles si la procédure de dosage est effectuée dans le respect le plus strict des instructions et des bonnes pratiques de laboratoire.

Toute manipulation incorrecte des échantillons ou toute modification de ce test peut affecter 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 β-HCG dans un échantillon.

10.3 Effet de surdosage

Jusqu'à 15 800 mIU/mL de β-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 DRG.

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 / BIBLIOGRAPHIE

Voir le manuel de l'utilisateur en version anglaise.

SYMBOLS USED

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