

Product information

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



hCG ELISA



DE1469



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.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 dei Contenuti / Tabla de Contenidos / Table des matières

1	INTENDED USE	4
2	PRINCIPLE OF THE TEST	4
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	5
4	REAGENTS.....	6
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	7
6	ASSAY PROCEDURE	7
7	EXPECTED NORMAL VALUES	9
8	QUALITY CONTROL	9
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	10
10	LIMITATIONS OF USE	11
11	LEGAL ASPECTS	11
1	ZWECKBESTIMMUNG	12
2	TESTPRINZIP	12
3	VORSICHTSMAßNAHMEN	13
4	BESTANDTEILE DES KITS	14
5	PROBENVORBEREITUNG	15
6	TESTDURCHFÜHRUNG	15
7	ERWARTETE WERTE.....	17
8	QUALITÄTSKONTROLLE.....	17
9	ASSAY-CHARAKTERISTIKA.....	18
10	GRENZEN DES TESTS.....	18
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	18
1	DESTINAZIONE D'USO	19
2	PRINCIPIO DEL TEST	19
3	PRECAUZIONI	19
4	COMPONENTI DEL KIT	20
5	CAMPIONI.....	21
6	ATTUAZIONE DEL TEST	21
7	VALORI NORMALI.....	23
8	CONTROLLO QUALITÀ.....	23
9	CARATTERISTICHE DEL TEST.....	24
10	LIMITAZIONE DEL TEST.....	24
11	ASPETTI LEGALI	24

1	FINALIDAD PREVISTA.....	25
2	FUNDAMENTO DEL ENSAYO	25
3	PRECAUCIONES.....	25
4	COMPONENTES DEL KIT.....	26
5	MUESTRAS.....	27
6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	27
7	VALORES ESPERADOS	29
8	CONTROL DE CALIDAD	30
9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	30
10	LIMITACIONES DE USO	30
11	ASPECTOS LEGALES	31
1	UTILISATION PRÉVUE	32
2	PRINCIPE DU TEST	32
3	PRECAUTIONS D'UTILISATION.....	32
4	RÉACTIFS.....	33
5	ECHANTILLON	34
6	RÉALISATION DU TEST	34
7	VALEURS ATTENDUES.....	36
8	CONTRÔLE DE QUALITÉ	37
9	CARACTERISTIQUES DU TEST	37
10	LIMITES D'UTILISATION.....	37
11	ASPECTS LEGAUX.....	38
	REFERENCES / LITERATURE	39
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	40

1 INTENDED USE

The **DEMEDITEC HCG ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative in vitro diagnostic measurement of intact human chorionic gonadotropin (hCG) in serum or plasma (EDTA, lithium heparin or citrate plasma).

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

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

HCG Assays are used for the early detection of pregnancy.

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

2 PRINCIPLE OF THE TEST

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

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of 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 microtiterplate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with Stop Solution containing 0.5 M 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 DEMEDITEC.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **SORB** **MT** **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells; Wells coated with anti- β -hCG antibody (monoclonal).
2. **CAL** **1** – **5** **LYO** **Standard (Standard 1-5)**, 5 vials (lyophilized), 1.0 mL;
Concentrations: 5; 50; 200; 500; 1000 mIU/mL
Conversion: 1 pg/mL = 0,00916 mIU/mL The standards are calibrated against the following reference material: 5th WHO International Standard Chorionic Gonadotrophin NIBSC code: 07/364
See "Reagent Preparation". Contain non-mercury preservative.
3. **SAM** **DIL** **Sample Diluent**, 1 vial, 10 mL, ready to use, Contains non-mercury preservative.
4. **ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 11 mL, ready to use, Monoclonal antibody against the alpha-subunit conjugated to horseradish peroxidase; Contains non-mercury preservative.
5. **SUB** **TMB** **Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use, Tetramethylbenzidine (TMB).
6. **STOP** **SOLN** **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use, contains 0.5 M H₂SO₄,
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.

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
- Linear graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

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

4.4 Reagent Preparation

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

Standards

Reconstitute the lyophilized content of the standard vials with 1.0 mL distilled water and let stand for 10 minutes in minimum. Mix several times before use.

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

4.5 Disposal of the Kit

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

4.6 Damaged Test Kits

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

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or plasma (EDTA, lithium heparin or citrate plasma) can 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.

Plasma:

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

5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 5 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying. Specimens held for a longer time should be frozen only once at -20 °C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Specimen Dilution

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 sample + 90 µL Sample Diluent (mix thoroughly)
- b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL Sample Diluent (mix thoroughly).

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

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

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

6.2 Test Procedure (Quantitative Method)

Each run must include a standard curve.

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

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **25 µL** of each **Standard, Control** and **samples** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **100 µL Enzyme Conjugate** into each well.
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
5. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **5 times** with distilled water (400 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.

Important note:

The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!

6. Add **100 µL** of **Substrate Solution** to each well.
7. Incubate for **10 minutes** at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **50 µL** of **Stop Solution** to each well.
9. Measure the optical density of the solution in each well at **450 nm (reading)** and at **620 nm to 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 Test Procedure (Qualitative Method)

This procedure differentiates positive (pregnant) from negative samples by comparing the sample hCG levels with Standard 1 (5 mIU/mL) and Standard 2 (50 mIU/mL).

Patient samples are run in parallel with the Standard 1 (5 mIU/mL) and the 50 mIU/mL Standard 2. The assay procedure is identical with the Quantitative Method, but step 8 and 9 is omitted.

6.4 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 > 1000 mIU/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.4.1 Example of Typical Standard Curve

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

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

6.5 Qualitative Results

For a qualitative analysis of the hCG level the colour development of the specimen is compared with the colour of the Standard 1 (5 mIU/mL) and Standard 2 (50 mIU/mL).

If the blue colour is less intense than the colour of the 50 mIU/mL Standard, the sample is considered as negative. If the blue colour is more intense than or equal to the colour of the 50 mIU/mL Standard the sample is considered as positive.

7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values. The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

7.1 Normal healthy adults, non-pregnant

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

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

7.2 Normal serum hCG levels during pregnancy

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

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

CAUTION :

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

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels. The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results. It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results. Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods. After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DEMEDITEC directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 5 – 1000 mIU/mL.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

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

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

9.3 Sensitivity

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

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra Assay

The within assay variability is shown below:

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

9.4.2 Inter Assay

The between assay variability is shown below:

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

9.5 Recovery

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

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

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

9.6 Linearity

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

10 LIMITATIONS OF USE

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

10.1 Interfering Substances

Haemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and Triglyceride (up to 30 mg/mL) have no influence on the assay results.

10.2 Drug Interferences

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

10.3 High-Dose-Hook Effect

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

11 LEGAL ASPECTS**11.1 Reliability of Results**

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

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient. Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived. The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

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

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

1 ZWECKBESTIMMUNG

Der **DEMEDIATEC HCG ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von humanem Chorionadotropin (hCG) in Serum und Plasma (EDTA-, Lithium-Heparin- oder Zitratplasma) eingesetzt.

Nur für in-vitro Diagnostik.

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

2 TESTPRINZIP

Der DEMEDIATEC HCG ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der Sandwichtechnik basiert. Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine definierte Antikörper-Bindungsstelle des hCG-Moleküls gerichtet ist. Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und mit einem Enzymkonjugat inkubiert. Das Konjugat enthält monoklonale, gegen die Alpha-Kette des HCG-Moleküls gerichtete Antikörper, die mit Meerrettichperoxidase konjugiert sind. Es wird ein Sandwichkomplex gebildet. Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbreaktion nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist proportional der hCG-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

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 Waschschritts 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 DEMEDITEC Diagnostics GmbH erhältlich.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **SORB** **MT** **Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar); Mit anti- β -hCG-Antikörper (monoklonal) beschichtet.
2. **CAL** **1** – **5** **LYO** **Standard (Standard 1-5)**, 5 Fläschchen (lyophilisiert), je 1,0 mL;
Konzentrationen: 5; 50; 200; 500; 1000 mIU/mL
Umrechnungsfaktor: 1 pg/mL = 0,00916 mIU/mL
Die Standards sind gegen das folgende Referenzmaterial kalibriert: 5th WHO International Standard Chorionic Gonadotrophin NIBSC code: 07/364
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **SAM** **DIL** **Sample Diluent** (Probenverdunnungsmedium), 1 Fläschchen, 10 mL, gebrauchsfertig;
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 11 mL, gebrauchsfertig;
monoklonaler Antikörper gegen die Alpha-Kette, mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **SUB** **TMB** **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
Substratlösung TMB.
6. **STOP** **SOLN** **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
enthält 0,5 M H₂SO₄, Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.

Anmerkung: Zusätzliches Sample Diluent zur Probenverdunnung ist auf Anfrage erhältlich.

4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät (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 bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

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

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

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

Standards

Rekonstituieren Sie den lyophilisierten Inhalt der Standardfläschchen mit 1,0 mL destilliertem Wasser und lassen Sie die Fläschchen mindestens 10 Minuten ruhen. Vor Gebrauch mehrmals vorsichtig schütteln

Achtung: Bei 2 °C bis 8 °C sind die rekonstituierten Standards 2 Monate haltbar. Für eine längere Aufbewahrung bei -20 °C einfrieren.

4.5 Entsorgung des Kits

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

4.6 Beschädigte Testkits

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

5 PROBENVORBEREITUNG

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

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.

Plasma:

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

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 5 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Für eine längere Aufbewahrung sollten die Proben eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

5.3 Probenverdünnung

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 Probe + 90 µL Sample Diluent gründlich mischen)

b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL Sample Diluent (gründlich mischen).

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

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut 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.

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

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 25 µL Standard, Kontrollen und Proben mit neuen Plastikspitzen** in die entsprechenden Wells geben.
3. **100 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben.
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
4. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **5-mal** mit destilliertem Wasser waschen (400 µL pro Well). Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
6. **100 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
7. **10 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
9. Die Optische Dichte (OD) bei **450 nm (Messung) und 620 nm bis 630 nm (Abzug des Hintergrundes, empfohlen)** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der **Stop Solution** bestimmen.

6.3 Testdurchführung (qualitative Methode)

Dieses Verfahren ermöglicht die Unterscheidung zwischen positiven (Schwangerschaftsnachweis) und negativen Proben durch Vergleich der Patientenproben mit Standard 1 (5 mIU/mL) und dem Standard 2 mit 50 mIU/mL).

Testdurchführung wie unter "Quantitative Methode" beschrieben. Die Schritte 8 und 9 entfallen.

6.4 Ergebnisermittlung (quantitative Methode)

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.

6.4.1 Beispiel für eine Standardkurve

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

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

6.5 Qualitative Ergebnisse

Für die qualitative Auswertung wird die Farbintensität der Probe mit der Farbintensität des Standard 1 (5 mIU/mL) und des Standard 2 mit 50 mIU/mL verglichen.

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

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

7 ERWARTETE WERTE

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

7.1 Gesunde, nicht schwangere Erwachsene

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

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

7.2 Serum-hCG-Werte in der Schwangerschaft

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

Anmerkung: Bei Spontanaborten und bei Vorliegen einer ektopischen Schwangerschaft werden niedrigere Werte ermittelt.

(Siehe hierzu: Braunstein, G. a.o., First-trimester chorionic gonadotropin measurements as an aid in the diagnosis of early pregnancy disorders. In: American Journal of Obstetrics and Gynaecology, V. 131, No. 1., pp. 25-32. May 1978, St. Louis)

ACHTUNG:

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.

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 DEMEDITEC in Verbindung.

9 ASSAY-CHARAKTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 5 – 1000 mIU/mL.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert plus der zweifachen Standardabweichung des Sample Diluent (n = 20), beträgt < 5 mIU/mL.

Die Daten zu:

9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

10 GRENZEN DES TESTS

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

10.1 Interferenzen

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0.5 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 30 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

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

10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook Effekt tritt bei Proben mit bis zu 13.300 mIU/mL hCG nicht auf.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen. Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1 genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

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

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

1 DESTINAZIONE D'USO

Il test immuno-enzimatico **DEMEDIATEC HCG ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa di gonadotropina corionica (hCG) in siero e plasma (EDTA, eparina di litio o plasma di citrato). **Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.**

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

2 PRINCIPIO DEL TEST

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

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

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

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

3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- 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 DEMEDIATEC Diagnostics GmbH.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

1. **SORB** **MT** **Microtiterwells** (Micropozzetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti; Pozzetti ricoperti con l'anti- β -hCG anticorpo (monoclonale)
2. **CAL** **1** – **5** **LYO** **Standard (Standard 1-5)**, 5 flaconi (liofilizzati), 1,0 mL; Concentrazione: 5; 50; 200; 500; 1000 mIU/mL
Conversione: 1 pg/mL = 0,00916 mIU/ml
Gli standard sono 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. **SAM** **DIL** **Sample Diluent** (Diluente dei campioni), 1 flacone, 10 mL, pronto all'uso; Contiene conservante senza mercurio.
4. **ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate** (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 11 mL, pronto all'uso; Anticorpo monoclonale (anti- α -subunit) coniugato alla perossidasi di rafano
Contiene conservante senza mercurio.
5. **SUB** **TMB** **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; TMB (benzidine tetrametilico).
6. **STOP** **SOLN** **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

- Lettore di piastre di microtitolazione calibrato (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 a 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 a 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente.

4.4 Preparazione dei reagenti

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

Standards

Ricostituire il contenuto liofilizzato dei flaconi con gli standard con 1,0 mL acqua distillata e far riposare per almeno 10 minuti. Mescolare alcune volte prima dell'uso.

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

4.5 Smaltimento del kit

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

4.6 Test kits danneggiati

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

5 CAMPIONI

Siero o plasma (EDTA-, Eparina- or citrate plasma) può essere usato per questo test.

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 anti-coagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

Plasma:

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

5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere magazzinati ben chiusi fino a 5 giorni a 2 °C a 8 °C.

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

5.3 Diluizione dei campioni

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 campione + 90 µL Sample Diluent (agitare bene)

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

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

6 ATTUAZIONE DEL TEST

6.1 Indicazioni generali

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

6.2 Esecuzione del test (metodo quantitativo)

Ogni analisi deve includere una curva standard.

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

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Pipettare **25 µL** di ogni **Standard, controllo e campione** nei pozzetti, cambiando ogni volta la punta monouso.
3. Pipettare **100 µL Enzyme Conjugate** in ogni pozzetto.
Agitare bene per 10 secondi. È molto importante raggiungere un completo mescolamento.
4. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
5. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **5 volte** con acqua distillata (400 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
Importante:
La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto esecuzione del lavaggio!
6. Aggiungere **100 µL** della **Substrate Solution** ad ogni pozzetto.
7. Incubare per **10 minuti** a temperatura ambiente.
8. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **50 µL** della **Stop Solution** ad ogni pozzetto.
9. Determinare la densità ottica (DO) della soluzione in ogni pozzetto **a 450 nm (lettura) e a 620 nm a 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 Esecuzione del test (metodo qualitativo)

Questo procedimento distingue campioni positivi (gravidanza) da campioni negativi comparando i livelli hCG con quelli del Standard 1 (5 mIU/mL) e dello Standard 2 (50 mIU/mL).

I campioni dei pazienti vanno analizzati assieme al Standard 1 (5 mIU/mL) e allo Standard 2 (50 mIU/mL).

Il procedimento del test è identico a quello del metodo quantitativo; soltanto i passaggi 8 e 9 sono omessi.

6.4 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.

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

6.5 Risultati qualitativi

Per una analisi qualitativa dei livelli hCG lo sviluppo del colore dei campioni è paragonato a quello del Standard 1 (5 mIU/mL) e dello Standard 2 (50 mIU/mL). Se il colore blu è meno intenso di quello dello Standard 2 (50 mIU/mL), il campione è da considerare negativo.

Se il colore blu è più intenso o uguale a quello dello Standard 2 (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 DEMEDITEC HCG ELISA i seguenti valori sono stati ottenuti:

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

7.2 Livelli normali di hCG nel siero durante la gravidanza

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

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

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

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

PRECAUZIONI:

1. Per la determinazione di gravidanza, si usa il procedimento qualitativo, con un valore soglia di 50 mIU/mL. Risultati negativi o borderline dovrebbero essere ripetuti con campioni freschi al 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.

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 DEMEDITEC.

9 CARATTERISTICHE DEL TEST

9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 5 – 1000 mIU/mL.

9.2 Specificità degli anticorpi (reazioni ad incrocio)

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.3 Sensitività analitica

La sensitività analitica è stata calcolata dai valori medi più due deviazioni standard di venti (20) repliche dello Sample Diluent ed erano < 5 mIU/mL.

Dati dettagliati su

9.4 Precisione

9.5 Ritrovato

9.6 Linearità

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

10 LIMITAZIONE DEL TEST

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

10.1 Sostanze interferenti

Emoglobina (fino a 4 mg/mL), bilirubina (fino a 0.5 mg/mL) e trigliceridi (fino a 30 mg/mL) non influenzano i risultati di questo test.

10.2 Droghe interferenti

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

10.3 Effetto Hook di alti dosaggi

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

11 ASPETTI LEGALI

11.1 Affidabilità dei risultati

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

11.2 Conseguenze terapeutiche

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

11.3 Responsabilità legali

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

1 FINALIDAD PREVISTA

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

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

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

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

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

3 PRECAUCIONES

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

4 COMPONENTES DEL KIT

4.1 Componentes del Kit

1. **SORB** **MT** **Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12 x 8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti- β -hCG (monoclonal).
2. **CAL** **1** – **5** **LYO** **Standard (Standard 1-5)**, (Estándar), 5 viales (liofilizados), 1,0 mL; Concentraciones: 5; 50; 200; 500; 1000 mIU/mL
Conversión: 1 pg/mL = 0,00916 mIU/mL
Los estándares están calibrado contra el siguiente material de referencia: 5th WHO International Standard Chorionic Gonadotrophin NIBSC code: 07/364
Ver "Preparación de los Reactivos"; Contiene conservante sin mercurio.
3. **SAM** **DIL** **Sample Diluent** (Solución para dilución de la muestra), 1 vial, 10 mL, listo para usar, Contiene conservante sin mercurio.
4. **ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático), 1 vial, 11 mL, listo para usar, Anticuerpo (anti- α -subunit) conjugado con la Peroxidasa de rábano; Contiene conservante sin mercurio.
5. **SUB** **TMB** **Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 14 mL, listo para usar, Tetrametilbencidina (TMB).
6. **STOP** **SOLN** **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.

4.4 Preparación de los Reactivos

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

Standards

Reconstituir los contenidos liofilizados de los viales de los estándares con 1,0 mL de agua destilada y dejar reposar como mínimo durante 10 minutos. Mezclar varias veces antes de usar.

Nota: Los estándares reconstituidos son estables durante 2 meses a 2 °C - 8 °C.

Para períodos más largos congelar a -20 °C.

4.5 Eliminación del Kit

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

4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a DEMEDITEC, no 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 o plasma (EDTA, heparina de litio o plasma de citrato).

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.

Plasma:

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

5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 5 días a 2 °C a 8 °C antes del ensayo.

Las muestras almacenadas por un período de tiempo mas largo han de congelarse sólo una vez a -20 °C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

5.3 Dilución de las muestras

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

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

6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada estándar, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La 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 (Método Cuantitativo)

Cada uno debe incluir una curva de estándares.

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

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

Nota importante:

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

6. Adicionar **100 µL** de **Substrate Solution** a cada pocillo.
7. Incubar durante **10 minutos** a temperatura ambiente.
8. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **50 µL** de **Stop Solution** a cada pocillo.
9. Determinar la densidad óptica (DO) de la solución en cada pocillo a **450 nm (lectura) y a 620 nm a 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 (Stop Solution).

6.3 Procedimiento de ensayo (Método Cualitativo)

Este procedimiento diferencia entre muestras positivas (embarazada) y negativas mediante la comparación de los niveles de hCG de la muestra con el Standard 1 (5 mIU/mL) y el Standard 2 (50 mIU/mL).

Las muestras de pacientes se corren en paralelo con el Standard 1 (5 mIU/mL) y el Standard 2 (50 mIU/mL).

El procedimiento de ensayo es idéntico con el Método cuantitativo, pero se omiten los pasos 8 y 9.

6.4 Cálculo de los Resultados (Método 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 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.

6.4.1 Ejemplo de una Curva Estándar Típica

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

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

6.5 Resultados Cualitativos

Para un análisis cualitativo de los niveles de hCG el desarrollo del color de la muestra se compara con el color del Standard 1 (5 mIU/mL) y del estándar 2 (50 mIU/mL).

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

7 VALORES ESPERADOS

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

7.1 Adultos normales sanos, no embarazadas

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

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

7.2 Niveles normales de hCG en suero durante el embarazo

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

Durante las primeras seis semanas de embarazo, las concentraciones de hCG en suero se doblan aproximadamente de dos días. Después del parto, los niveles de hCG caen rápidamente y desaparecen completamente a los pocos días. Niveles muy bajos de hCG pueden presentarse en embarazos ectópicos (ver Braunstein, G. a.o., First-trimester chorionic gonadotropin measurements as an aid in the diagnosis of early pregnancy disorders. In: American Journal of Obstetrics and Gynecology, V. 131, No. 1., pp. 25-32. May 1978, St. Louis), mientras que condiciones como coriocarcinoma, neoplasmas trofoblasticos o no trofoblasticos o mola hidatiforme pueden mostrar concentraciones muy elevadas de hCG.

PRECAUCIÓN:

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

8 CONTROL DE CALIDAD

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

Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados.

Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados.

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

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

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

9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1 Rango dinámico del ensayo

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

9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.3 Sensibilidad Analítica

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

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

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

10.1 Sustancias que pueden interferir

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

10.2 Interferencias con drogas

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

10.3 Efecto Gancho-Dosis-Elevada

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

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo. Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DEMEDITEC.

11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente. Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas. Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

11.3 Responsabilidad

Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición. Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

1 UTILISATION PRÉVUE

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

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

Les microplaques sont recouvertes avec un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène spécifique de la molécule hCG. Un aliquot de l'échantillon contenant le (la) hCG endogène est incubé dans un puits avec l'enzyme conjuguée, c'est-à-dire un anticorps (anti- α -subunit) monoclonal conjuguée avec la peroxidase de Raifort (horseradish peroxidase, HRP). Après l'incubation, le conjugué non-lié est éliminé durant le lavage des puits. La quantité de conjugué-HRP liée est proportionnelle à la concentration de HCG contenu(e) dans l'échantillon. Suite à l'addition de solution substrat, l'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la concentration de hCG contenu(e) dans l'échantillon.

3 PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Ce kit est uniquement destiné aux tests diagnostiques in vitro.
- 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.
- Éviter 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 DEMEDIATEC Diagnostics GmbH.

4 RÉACTIFS

4.1 Réactifs fournis

1. **SORB** **MT** **Microtiterwells** (Microplaques), 12 x 8 (à détacher) barrettes, plaques de 96 puits; Les puits sont recouverts avec un anticorps anti- β -hCG (monoclonal).
2. **CAL** **1** – **5** **LYO** **Standard (Standard 1-5)**, 5 flacons (lyophilisés), 1 mL;
Concentrations: 5; 50; 200; 500; 1000 mIU/mL
Conversion: 1 pg/mL = 0,00916 mIU/mL
Les standards 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. **SAM** **DIL** **Sample Diluent** (Solution pour dilution de l'échantillon), 1 flacon, 10 mL, prêt à l'emploi, Contient agent de conservation sans mercure.
4. **ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate** (Conjugué enzymatique), 1 flacon, 11 mL, prêt à l'emploi, Anticorps (anti- α -subunit) conjugué à la HRP; Contient agent de conservation sans mercure.
5. **SUB** **TMB** **Substrate Solution** (Solution substrat), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi, Tétraméthylbenzidine (TMB).
6. **STOP** **SOLN** **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
- De l'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.

4.4 Préparation des réactifs

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

Standards

Reconstituer le contenu lyophilisé des flacons de standards avec 1,0 mL d'eau distillée et laisser incuber au minimum 10 minutes. Mélanger plusieurs fois avant utilisation.

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

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

4.5 Elimination des déchets relatifs au kit

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

4.6 Kits endommagés

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

5 ECHANTILLON

Sérum ou plasma (plasma EDTA, héparine de lithium ou citrate) peuvent être utilisés pour 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.

Plasma:

Le sang total doit être prélevé dans des tubes de centrifugation contenant un anti-coagulant (Sarstedt Monovette avec une préparation appropriée de plasma) et centrifugé immédiatement après le prélèvement.

5.2 Conservation des échantillons

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

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

5.3 Dilution de l'échantillon

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

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

Exemple:

- a) dilution 1:10: 10 µL de l'échantillon + 90 µL Sample Diluent (bien mélanger).
- b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL Sample Diluent (bien mélanger).

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

6 RÉALISATION DU TEST

6.1 Remarques générales

- Tous les réactifs et échantillons doivent être amenés à température ambiante avant utilisation. Tous les réactifs doivent être mélangés, sans formation de mousse.
- Une fois la procédure engagée, toutes les étapes doivent être réalisées sans interruption.
- Utiliser un 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 (méthode quantitative)

Chaque test doit inclure une courbe étalon.

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

1. Disposer le nombre de puits de micro-titration désiré dans le support.
2. Déposer **25 µL** de chaque **Standard, Control** et les **échantillons**, avec de nouveaux cônes de pipette, dans les puits appropriés.
3. Déposer **100 µL d'Enzyme Conjugate** dans chaque puits.
Bien mélanger pendant 10 secondes. Il est important d'obtenir un mélange parfait lors de cette étape.
4. Incuber pendant **30 minutes** à température ambiante.
5. Décanter le contenu des puits et rincer les puits **5 fois** avec de l'eau distillée (400 µL par puits). Tapoter les puits sur du papier absorbant afin d'éliminer les gouttelettes résiduelles.
Remarque importante:
La sensibilité et la précision de ce test sont fortement dépendantes de la bonne réalisation des étapes de lavage !
6. Ajouter **100 µL** de **Substrate Solution** à chaque puits.
7. Incuber pendant **10 minutes** à température ambiante.
8. Stopper la réaction enzymatique en ajoutant **50 µL** de **Stop Solution** à chaque puits.
9. Déterminer la densité optique (DO) de la solution dans chaque puits à **450 nm (lecture) et à 620 nm à 630 nm (soustraction de fond, recommandée)** à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaques.
Il est recommandé de lire les puits dans les **10 minutes** qui suivent l'ajout de la solution d'arrêt (Stop Solution).

6.3 Protocole d'essai (méthode qualitative)

Ce protocole différencie les sérums positifs (enceinte) des échantillons négatifs, en comparant les taux d'hCG contenus dans les échantillons avec le Standard 1 (5 mIU/mL) et le Standard 2 (50 mIU/mL).

Les échantillons de patients sont traités en parallèle du Standard 1 (5 mIU/mL) et le Standard 2 (50 mIU/mL).

Le protocole d'essai est identique celui de la méthode quantitative, mais les étapes 8 et 8 sont omises.

6.4 Calcul des résultats (méthode 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.

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

6.5 Résultats qualitatifs

Pour une analyse qualitative du taux d'hCG, le développement coloré de l'échantillon est comparé à la couleur du Standard 1 (5 mIU/mL) et du standard 2 (50 mIU/mL).

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

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

7 VALEURS ATTENDUES

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

7.1 Adultes normaux sains, non enceintes

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

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

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

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

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

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

Précautions:

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

8 CONTRÔLE DE QUALITÉ

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

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

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

Utiliser les méthodes d'analyses statistiques appropriées pour l'analyse des valeurs contrôles et des tendances. Si les résultats ne correspondent pas aux limites établies des contrôles, les résultats concernant ces patients doivent être considérés 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 testé les points mentionnés, si aucune erreur n'est détectée, contacter votre distributeur ou directement la DEMEDITEC.

9 CARACTERISTIQUES DU TEST

9.1 Zone de mesure

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

9.2 Spécificité des anticorps (Réaction croisée)

Voir le manuel d'utilisateur en version anglaise.

9.3 Sensibilité de l'analyse

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

Pour

9.4 Précision

9.5 Recouvrement

9.6 Linéarité

consulter la version anglaise détaillée du mode d'emploi

10 LIMITES D'UTILISATION

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

10.1 Substances parasites

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

10.2 Drogues parasites

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

10.3 Effet de surdosage

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

11 ASPECTS LEGAUX

11.1 Fiabilité des résultats

Ce test doit être exactement utilisé selon les instructions d'utilisation du fabricant. De plus, les utilisateurs doivent strictement respecter les règles de la bonne pratique de laboratoire, ou autres lois nationales. Cela est spécialement le cas pour l'utilisation des réactifs contrôles. Pour chaque test, il est important d'inclure un nombre suffisant de contrôles, afin de pouvoir valider l'exactitude et la précision du test. Les résultats du test sont valides si et seulement si tous les contrôles sont compris dans les gammes de mesure mentionnées et si tous les autres paramètres du test sont également compris dans les instructions de ce test. En cas de doute ou d'inquiétude, contacter la DEMEDITEC.

11.2 Conséquences thérapeutiques

Les suites thérapeutiques ne devront jamais être basées sur les résultats de laboratoire seuls, même si les tous les résultats du test sont en accord avec les points mentionnés dans le paragraphe 11.1. Tout résultat n'est qu'une partie du tableau clinique complet d'un patient. Les suites thérapeutiques peuvent découler des résultats de laboratoire si et seulement si ceux-ci sont en accord avec l'ensemble du tableau clinique du patient. Le résultat du test en lui-même ne doit en aucun cas être le seul déterminant des suites thérapeutiques à suivre.

11.3 Responsabilité









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

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

REFERENCES / LITERATURE

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

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta y advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta