

# Product information

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



## beta-hCG free ELISA

CE 0483

IVD

REF DE4718

Σ 96



Demeditec Diagnostics GmbH  
Lise-Meitner-Strasse 2  
24145 Kiel – Germany  
[www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)

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

1	INTRODUCTION.....	3
2	PRINCIPLE OF THE TEST.....	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	4
4	REAGENTS.....	5
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	6
6	ASSAY PROCEDURE.....	6
7	EXPECTED NORMAL VALUES.....	8
8	QUALITY CONTROL.....	10
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	11
10	LIMITATIONS OF USE.....	12
11	LEGAL ASPECTS.....	12
12	REFERENCES / LITERATURE.....	12
1	EINLEITUNG.....	13
2	TESTPRINZIP.....	13
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	13
4	BESTANDTEILE DES KITS.....	14
5	PROBENVORBEREITUNG.....	15
6	TESTDURCHFÜHRUNG.....	15
7	ERWARTETE WERTE.....	17
8	QUALITÄTS-KONTROLLE.....	19
9	ASSAY CHARACTERISTIKA.....	20
10	GRENZEN DES TESTS.....	20
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN.....	20
12	REFERENZEN / LITERATUR.....	20
1	INTRODUZIONE.....	21
2	PRINCIPIO DEL TEST.....	21
3	PRECAUZIONI.....	21
4	COMPONENTI DEL KIT.....	22
5	CAMPIONI.....	23
6	ATTUAZIONE DEL TEST.....	23
7	VALORI NORMALI.....	25
8	CONTROLLO QUALITÀ.....	27
9	CARATTERISTICHE DEL TEST.....	28
10	LIMITAZIONE DEL TEST.....	28
11	ASPETTI LEGALI.....	28
12	BIBLIOGRAFIA.....	28
1	INTRODUCCIÓN.....	29
2	FUNDAMENTO DEL ENSAYO.....	29
3	PRECAUCIONES.....	29
4	COMPONENTES DEL KIT.....	30
5	MUESTRAS.....	31
6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO.....	31
7	VALORES ESPERADOS.....	33
8	CONTROL DE CALIDAD.....	35
9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO.....	36
10	LIMITACIONES DE USO.....	36
11	ASPECTOS LEGALES.....	37
12	REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA.....	37
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS.....	40

## 1 INTRODUCTION

### 1.1 Intended Use

The **Free  $\beta$ -HCG ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative in vitro diagnostic measurement of free beta subunit of human chorionic gonadotropin (free  $\beta$ -hCG) in serum and EDTA plasma.

### 1.2 Summary and Explanation

Human Chorionic Gonadotropin (hCG) is a glycoprotein hormone normally produced by placenta during pregnancy. The hormone is present in blood and urine around seven to thirteen days following implantation of the fertilized ovum. Structurally intact hCG molecules consist of two non-covalently linked polypeptide subunits, the alpha and beta chain subunits. Measurement of intact hCG and of the alpha subunit of hCG appears to give similar results in blood and urine but not the levels of beta subunit. The measurement of free  $\beta$ -HCG in the first trimester of pregnancy has been reported as a useful marker in antenatal screening for Down Syndrome and other fetal aneuploidies. Increased free  $\beta$ -HCG values in combination with maternal age, the measurement of PAPP-A and the ultrasonic determination of nuchal translucency (NT) in pregnancy weeks 11 to 14 may detect up to 90 % of pregnancies with Down Syndrome (reference 15).

**The free  $\beta$ -HCG ELISA DE4718 may be used for the risk assessment of Down's Syndrome (trisomy 21) in the first trimester of pregnancy. For the risk assessment of trisomy 21 and other fetal aneuploidies free beta HCG should always be measured in combination with other analytes (for example PAPP-A and NT, see above) and a special software for the risk assessment of trisomy 21. According to the IVD Directive (98/79/EC) both software and kits for the additional analytes must be suitable for trisomy 21 screening and CE-certified by a notified body, indicated by the identification number of the notified body on the CE-mark on software and kits.**

## 2 PRINCIPLE OF THE TEST

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

### 3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

- This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
- All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
- The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
- Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
- Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
- Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
- Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
- Allow the reagents to reach room temperature (21 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
- Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
- Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
- Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
- Avoid contact with Stop Solution containing 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. It may cause skin irritation and burns.
- Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
- TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
- Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
- For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DEMEDITEC.

## 4 REAGENTS

### 4.1 Reagents provided

1. **SORB MT Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells; Wells coated with anti- $\beta$ -HCG antibody (monoclonal).
2. **CAL 0 – 5 LYO Standard (Standard 0-5)**, 6 vials (lyophilized), 1.0 mL; Concentrations: 0 – 10.0 – 25.0 – 50.0 – 100.0 – 200.0 ng/mL; The concentrations of the Free  $\beta$ -HCG Kit standards match the WHO Reference Reagent Human Chorionic Gonadotrophin, Beta Subunit (Purified) (NIBSC code: 99/650). Conversion: 1 mIU = 1 ng. See „Preparation of Reagents“. Contain non-mercury preservative.
3. **CONTROL low & high LYO Control (Low and high)**, 2 vials (lyophilized), 1.0 mL, see „Preparation of Reagents“. For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet. Contain non-mercury preservative.
4. **SAM DIL Zero Buffer**, 1 vial, 14 mL, ready to use, Contains non-mercury preservative.
5. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate**, 1 vial, 18 mL, ready to use, Anti  $\beta$ -HCG antibody conjugated to horseradish peroxidase;
6. **SUB TMB Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use, Tetramethylbenzidine (TMB).
7. **STOP SOLN Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use, contains 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
8. **WASH SOLN 40x Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated); see „Preparation of Reagents“.

### 4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450  $\pm$ 10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- An incubator suitable for incubation 37 °C
- Absorbent paper.
- Distilled or Deionized water
- Timer (60 min. range).
- Linear graph paper or software for data reduction

### 4.3 Storage Conditions

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

### 4.4 Reagent Preparation

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

#### Standards

Reconstitute the lyophilized contents 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 up to 30 days at 2-8 °C. For longer storage freeze at -20 °C

#### Controls

Reconstitute the lyophilized content of the control vials with 1.0 mL distilled water and let stand for 10 minutes in minimum. Mix several times before use. **Note:** The reconstituted controls are stable for up to 30 days at 2-8 °C. For longer storage freeze at -20 °C

#### Wash Solution

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution. Dilute 30 mL of concentrated Wash Solution with 1170 mL deionized water to a final volume of 1200 mL. The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.

#### 4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheets (see chapter 13).

#### 4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, 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 EDTA plasma should be used in this assay. Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens. Please note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

#### 5.1 Specimen Collection

##### Serum:

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

##### EDTA plasma:

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

#### 5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 24 hours at 2-8 °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 Zero Buffer and reassayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

##### Example:

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

### 6 ASSAY PROCEDURE

#### 6.1 General Remarks

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

## 6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **50 µL** of each **Standard, Control** and **samples** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **100 µL Zero Buffer** into each well. Thoroughly mix for 30 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **30 minutes** at 37 °C.
5. Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells **5 times** with diluted Wash Solution (400 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.  
**Important note:** The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
6. Dispense **150 µL Enzyme Conjugate** into each well.
7. Incubate for **30 minutes** at 37 °C.
8. Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells **5 times** with diluted Wash Solution (400 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
9. Add **100 µL** of **Substrate Solution** to each well.
10. Incubate for **20 minutes** at room temperature.
11. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of **Stop Solution** to each well.  
It is important to make sure that all the blue color changes to yellow color completely.
12. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 ±10 nm** with a microtiter plate reader.  
It is recommended that the wells be read **within 15 minutes** after adding the Stop Solution.

## 6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using semi-logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the IFU 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 such. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

### 6.3.1 Example of Typical Standard Curve

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

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	0.02
Standard 1 (10.0 ng/mL)	0.22
Standard 2 (25.0 ng/mL)	0.46
Standard 3 (50.0 ng/mL)	0.81
Standard 4 (100.0 ng/mL)	1.28
Standard 5 (200.0 ng/mL)	1.97

## 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.

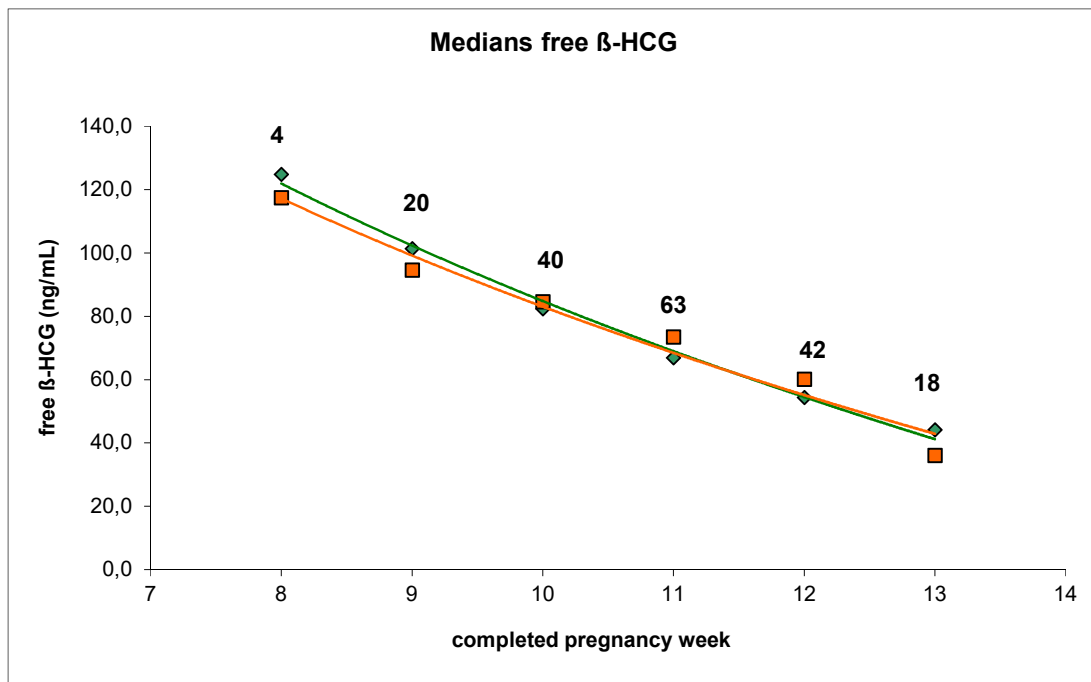
**NOTE:** All values/medians in this chapter have been determined in serum.

### 7.1 Free $\beta$ -hCG Subunit Levels in Normal Pregnancy

187 samples of pregnant women in the 1<sup>st</sup> trimester have been measured with the Free  $\beta$ -HCG ELISA. Using a semi-logarithmic plot the following regression equation was found:

$$\text{Median free } \beta\text{-HCG} = \text{EXP}(6.579 - 0.0297 * \text{gestation day}).$$

In the following diagram and table the medians for **completed pregnancy weeks 8 to 13** have been calculated. For comparison the medians were also determined manually (Median of week).



Week of pregnancy	Day of gestation	Median from regression equation [ng/mL]	Median of week [ng/mL]
8	59	124.8	117.4
9	66	101.4	94.6
10	73	82.3	84.6
11	80	66.9	73.4
12	87	54.3	60.1
13	94	44.1	36.0

Population and laboratory differences may lead to slightly different medians. Each laboratory should therefore determine and continuously update its own medians from its own patient collective. The regression equations and values in the table should be used as a guideline only. The calculation of medians and/or regression functions for the calculation of medians from own patient data bases should be performed with the applied trisomy 21 risk calculation software. Medians determined for the free  $\beta$ -HCG ELISA can not be used with assays of other manufacturers. Medians determined for free  $\beta$ -HCG assays of other manufacturers can not be used with the free  $\beta$ -HCG ELISA.



### 7.1.1 Use for Down Syndrome Screening

For risk calculation in prenatal screening free  $\beta$ -HCG concentrations are indicated as MOM (multiple of medians, MOM = Measured Concentration (free  $\beta$ -HCG) / Median free  $\beta$ -HCG). In Down Syndrome pregnancies the median of MOMs for free  $\beta$ -HCG are increasing during the first and second trimester (reference 16, details see table).

Completed week of pregnancy	10	11	12	13	14-20
Median of MOM in pregnancies with Down Syndrome	1.62	1.94	2.19	2.48	2.66

Data from reference 16

For risk calculation of trisomy 21 not only free  $\beta$ -HCG but also other parameters like PAPP-A and nuchal translucency (NT) for the 1<sup>st</sup> trimester and/or AFP, free Estriol and HCG for the 2<sup>nd</sup> trimester have to be determined. The use of these parameters for risk calculation of trisomy 21 requires special software. **According to the IVD Directive (98/79/EC) both software and kits for the additional analytes must be suitable for trisomy 21 screening and CE-certified by a notified body, indicated by the identification number of the notified body on the CE-mark on software and kits. The software must allow the calculation of medians from own patient measurements.**

It is imperative to take into consideration additional factors, e.g. age of the woman, weight, ethnic group and smoker/non-smoker. **An underestimation of the gestation age can lead to a falsely high calculated risk (false positive).** To reduce this source of error, it is important to **determine the gestation age as precisely as possible. Gestation age calculation from the last menstrual cycle inheres a high risk of variation. Sonographic determination of the crown-rump length (CRL) or biparietal diameter (BIP)** is recommended for the proper determination of the gestation age. Free  $\beta$ -HCG measurement in the course of a prenatal screening determines only a risk for trisomy 21. For proof of trisomy 21 genetic determinations are required.

### 7.2 hCG and Free Subunits Levels in Gestational Choriocarcinoma

Free  $\alpha$  and free  $\beta$ -subunits and hCG levels were measured in five patients with untreated gestational choriocarcinoma. The concentrations in serum are shown in the following table.

Patient Number	hCG (ng/mL)	Free $\alpha$ -hCG (ng/mL)	Free $\beta$ -hCG (ng/mL)
1	210,000	112	8,000
2	22,195	20	1,300
3	6,840	1	232
4	36,000	44	3,900
5	4,200	2	350

The levels of free  $\alpha$ -hCG were low, ranging from 1-112 ng/mL, whereas hCG levels ranged from 4,200 to 210,000 ng/mL (1 ng  $\approx$  15 mIU). In contrast, free  $\beta$ -hCG concentrations were found to be markedly elevated in choriocarcinoma.

### 7.3 Ectopic Production of hCG and Free Subunits by Nontrophoblastic Tumors

The following table shows results obtained in various tumors and healthy and benign disease controls: Measurement of hCG,  $\alpha$ -hCG, and  $\beta$ -hCG serum levels in nontrophoblastic tumors, benign disease, and healthy controls

Tumor type	No. of samples	hCG (ng/mL)	$\alpha$ -hCG (ng/mL)	$\beta$ -hCG (ng/mL)
Cervix	20	0	1 (1.6) <sup>a</sup>	1 (0.65)
Corpus uterus	20	0	0	0
Gastric	20	0	0	1 (1.5)
Pancreatic	20	0	1 (16.0)	2 (0.8, 3.1)
Colon	20	0	0	0
Lung	20	0	1 (90.0)	1 (0.7)
Ovarian	20	0	1 (1.8)	0
Prostate	20	0	1 (1.6)	0
Other digestive tract tumor	18	0	0	0
Total [%]	178	0	5 [3]	5 [3]
Benign disease controls	61	0	1 (1.6)	0
Healthy controls	50	0	0	0
Total [%]	111	0	1 [1]	0

<sup>a</sup> The number in parentheses represents the measured value in ng/mL.

The cut-off values for positive results are 1.5 ng/mL for hCG and  $\alpha$ -hCG and 0.4 ng/mL for  $\beta$ -hCG.

When compared with healthy control values, all nontrophoblastic cancer patients had hCG concentration within the normal range (~0.9 ng/mL). Free subunits were elevated in 10 of 178 patients. It is noteworthy that  $\alpha$ -hCG levels in two patients (pancreatic and lung tumors) were relatively high (16 and 90 ng/mL, respectively), whereas the maximum concentration of free  $\beta$ -hCG was only 3.1 ng/mL (pancreatic tumor).

## 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 0.2 – 200 ng/mL.

### 9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

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

Hormone tested	Concentration	Produced Color Intensity Equivalent to free $\beta$ -HCG in Serum
TSH	25 $\mu$ IU/mL	< 0.3 ng/mL
FSH	100 mIU/mL	< 0.2 ng/mL
Prolactin	100 mIU/mL	< 0.5 ng/mL
LH	200 mIU/mL	< 1 ng/mL

### 9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the ELISA was calculated by adding 2 standard deviations to the mean of 20 replicate analyses of the Zero Buffer and was found to be 0.2 ng/mL.

### 9.4 Reproducibility

#### 9.4.1 Intra-Assay

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	10	4.49	6.78
2	10	27.75	6.60
3	10	107.6	5.83

#### 9.4.2 Inter-Assay

The between assay variability (three different days) is shown below:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	9	14.94	8.00
2	9	26.34	8.03
3	9	100.94	6.73

### 9.5 Recovery

Recovery of the ELISA was determined by adding increasing amounts of the analyte to two different patient sera containing different amounts of endogenous analyte. Each sample (non-spiked and spiked) was assayed and analyte concentrations of the samples were calculated from the standard curve. The percentage recoveries were determined by comparing expected and measured values of the samples.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
<b>Concentration [ng/mL]</b>	25.73	97.12	99.88
<b>Average Recovery [%]</b>	101.8	90.5	99.88
<b>Range of Recovery [%]</b> from	98.4	86.2	93.7
to	109.4	94.9	99.4

### 9.6 Linearity

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
<b>Concentration [ng/mL]</b>	28.30	79.27	185.14
<b>Average Recovery [%]</b>	102.5	105.7	104.9
<b>Range of Recovery [%]</b> from	99.3	103.4	92.9
to	109.3	109.1	113.0

## 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 0.125 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 free  $\beta$ -HCG in a sample.

### 10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test up to 19800 ng/mL of free  $\beta$ -HCG.

## 11 LEGAL ASPECTS

### 11.1 Reliability of Results

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

### 11.2 Therapeutic Consequences

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

### 11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement. Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2 are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

## 12 REFERENCES / LITERATURE

1. Engall, E., *Methods in Enzymology*, volume 70, Van Vunakis, H. and Langone, J.J. (eds.), Academic Press, New York, 419-492 (1980).
2. Uotila M., Ripsöajto, E. and Engvall E., *J. Immunol. Methods*, 42, 11-15 (1981)
3. Brizot, ML, Jauniaux E, Mckie AT, Farzaneh F and Nicolaides KH. *Hum. Reprod.* 1995; 10; 2506-9.
4. Forest JC, Masse J, Rousseau F, Moutquin JM, Brideau NA and Belanger M. *Clin. Biochem.* 1995; 28:443-9.
5. Breimer L. *ann.Clin.Biochem* 1995;32:233.
6. Loncar K, Barnabei VM, and Larsen JW Jr. *Obstet. Gynecol. Surv.* 1995; 50:316-20
7. Densem J., and Wald NJ. *Prenat. Diagn.* 1995; 15:94-5.
8. Ozturk M, Berkowitz R, Goldstein D, Bellet D, Wands JR. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158:193-8.
9. Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW, et al. *Br Med J* 1988; 297:883-7.
10. Hay DL. *BR J Obstet Gynaecol* 1988; 95:1268-75.
11. Macri JN. et al. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163:1248-53.
12. Ozturk M, et al. *Endocrinology* 1987; 120:499-508.
13. Cole LA. et al. *Endocrinology* 1983; 113: 1176
14. Gaspard UJ et al. *Clin Endocrinol (OXF)* 1980; 13:319.
15. Bindra R, Heath V, Liao A, Spencer K, Nicolaides KH. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2002 Sep;20(3): 219-25. One-stop clinic for assessment of risk for trisomy 21 at 11-14 weeks: a prospective study of 15 030 pregnancies.
16. Wald NJ, Rodeck C, Hackshaw AK, Walters J, Chitty L, Mackinson AM. *Health Technol Assess.* 2003; 7(11). First and second trimester antenatal screening for Down's Syndrome: the results of the Serum, Urine and Ultrasound Screening Study (SURUSS).

## 1 EINLEITUNG

Der **Free  $\beta$ -HCG ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von freiem  $\beta$ -hCG in Serum und EDTA-Plasma eingesetzt. **Nur für In-vitro Diagnostik.**

## 2 TESTPRINZIP

Der Free  $\beta$ -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 freien  $\beta$ -hCG-Moleküls gerichtet ist. Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und mit einem Enzymkonjugat inkubiert. Das Konjugat enthält einen anti- $\beta$ -hCG-Antikörper, der mit Meerrettichperoxidase konjugiert ist. Es wird ein Sandwichkomplex gebildet. Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist proportional der Konzentration an freiem  $\beta$ -hCG in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

## 3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Material Sicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der Stop Solution sollte vermieden werden, da sie 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma 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- $\beta$ -hCG-Antikörper (monoklonal) beschichtet.
2. **CAL 0 – 5 LYO Standard (Standard 0-5)**, 6 Fläschchen (lyophilisiert), je 1 mL; Konzentrationen: 0 – 10.0 – 25.0 – 50.0 – 100.0 – 200.0 ng/mL. Die Standards sind kalibriert gegen das WHO-Referenzreagenz: Human Chorionic Gonadotrophin, Beta Subunit (Purified) (NIBSC-Ccode: 99/650). Umrechnungsfaktor: 1 mIU = 1 ng. Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **CONTROL low & high LYO Control Low & High** (Kontrolle), 2 Fläschchen, (lyophilisiert), je 1 mL. Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“. Kontrollwerte und –bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **SAM DIL Zero Buffer**, 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 18 mL, gebrauchsfertig; Anti- $\beta$ -hCG-Antikörper mit Meerrettichperoxidase konjugiert. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
6. **SUB TMB Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Substratlösung TMB.
7. **STOP SOLN Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; enthält 0,5 M  $H_2SO_4$ . Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
8. **WASH SOLN 40x Wash Solution** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X** konzentriert; Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

### 4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit  $450 \pm 10$  nm Filter)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser

### 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. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits 4 Wochen ihre Reaktivität.

### 4.4 Vorbereitung der Reagenzien

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

#### Standards

Rekonstituieren Sie den lyophilisierten Inhalt der Standardfläschchen mit 1 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 30 Tage haltbar. Für eine längere Aufbewahrung bei -20 °C einfrieren.

#### Control

Rekonstituieren Sie den lyophilisierten Inhalt der Fläschchen mit 1 mL destilliertem Wasser und lassen Sie die Fläschchen mindestens 10 Minuten ruhen. Vor Gebrauch mehrmals vorsichtig schütteln. Achtung: Bei 2-8 °C ist die rekonstituierte Kontrolle 30 Tage haltbar. Für eine längere Aufbewahrung bei -20 °C einfrieren.

#### Wash Solution

Die 40-fach konzentrierte Wash Solution (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen. Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.

#### 4.5 Entsorgung des Kits

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

#### 4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma 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 EDTA-Plasma kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden. Lipämische, ikterische und/oder stark hämolysierte Proben sollten nicht verwendet werden. Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

#### 5.1 Probenentnahme

##### Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette 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.

##### EDTA-Plasma:

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

#### 5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 24 Stunden bei 2 °C 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 Zero Buffer weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

##### Beispiel:

- a) Verdünnung 1:10: 10 µL Probe + 90 µL Zero Buffer gründlich mischen)
- b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL Zero Buffer (gründlich mischen).

### 6 TESTDURCHFÜHRUNG

#### 6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

## 6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 50 µL Standard, Control und Proben mit neuen Plastikspitzen** in die entsprechenden Wells geben.
3. **100 µL Zero Buffer** in jedes Well geben. Für 30 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
4. **30 Minuten** bei 37 °C inkubieren.
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **5-mal** mit verdünnter Wash Solution (400 µL) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.  
**Achtung:** Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
6. **150 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben. Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
7. **30 Minuten** bei 37 °C inkubieren.
8. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **5-mal** mit verdünnter Wash Solution (400 µL) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
9. **100 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
10. **20 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
11. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
12. Die Optische Dichte bei **450 ±10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der **Stop Solution** bestimmen.

## 6.3 Ergebnisermittlung

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

### 6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

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

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	0.02
Standard 1 (10.0 ng/mL)	0.22
Standard 2 (25.0 ng/mL)	0.46
Standard 3 (50.0 ng/mL)	0.81
Standard 4 (100.0 ng/mL)	1.28
Standard 5 (200.0 ng/mL)	1.97



## 7 ERWARTETE WERTE

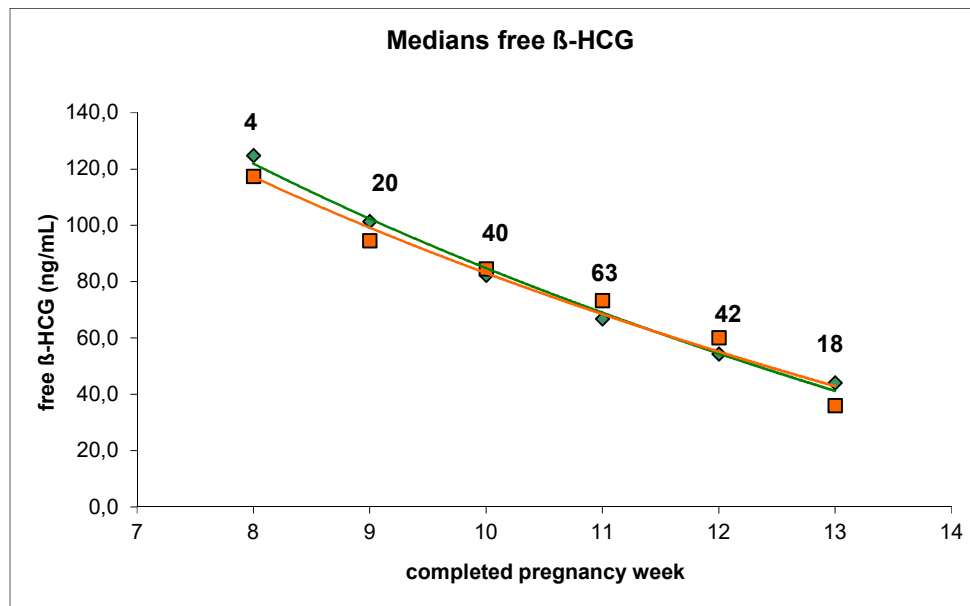
Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt. Das Testergebnis sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen. Weitere Laboruntersuchungen und das klinische Gesamtbild sind zu berücksichtigen. **ACHTUNG:** Alle angegebenen Werte/Mediane in diesem Kapitel wurden in Serum ermittelt.

### 7.1 Free $\beta$ -hCG-Level bei normaler Schwangerschaft im 1. Trimester

Die Proben von 187 schwangeren Frauen im 1. Trimester wurden mit dem Free  $\beta$ -HCG ELISA gemessen. Unter Verwendung der semi-logarithmischen Regression ergab sich folgende Regressionsfunktion:

$$\text{Median freies } \beta\text{-HCG} = \text{EXP}(6.579 - 0.0297 * \text{Gestationstag}).$$

In der folgenden Grafik und Tabelle wurden die Funktions-Mediane (Median (f)) für die **abgeschlossenen Schwangerschaftswochen** 8 bis 13 berechnet. Zum Vergleich wurden die Mediane zusätzlich manuell bestimmt (Wochen-Median).



Abgeschlossene Schwangerschaftswoche	Gestationstag	Median aus Regressionsfunktion [ng/mL]	Wochenmedian [ng/mL]
8	59	124,8	117,4
9	66	101,4	94,6
10	73	82,3	84,6
11	80	66,9	73,4
12	87	54,3	60,1
13	94	44,1	36,0

In unterschiedlichen Populationen und Laboratorien können leicht abweichende Mediane auftreten. Jedes Labor sollte daher aus dem eigenem Patientenkollektiv eigene Mediane bestimmen und diese fortlaufend aktualisieren. Die in der Tabelle angegebenen Werte sowie die Regressionsgleichungen sollten nur als Anhaltspunkt verwendet werden. Die Berechnung von Medianen oder Regressionsgleichungen aus eigenen Patientendaten sollte über die verwendete Risikoermittlungssoftware erfolgen. Für den Free  $\beta$ -HCG ELISA ermittelte Mediane können nicht mit freien  $\beta$ -HCG Assays anderer Hersteller verwendet werden. Mediane, die für Assays anderer Hersteller ermittelt wurden, können nicht für den Free  $\beta$ -HCG ELISA verwendet werden.

### 7.1.1 Einsatz für die Risikoberechnung des Down Syndroms

Für die Risikoberechnung im pränatalen Screening werden die freien  $\beta$ -HCG-Konzentrationen als MOM-Werte (multiple of medians) angegeben: MOM = gemessene (freies  $\beta$ -HCG) Konzentration / Median (freies  $\beta$ -HCG). Bei Schwangerschaften mit Down Syndrom steigen die Mediane der MOMs für freies  $\beta$ -HCG während des ersten und zweiten Trimenons an (Referenz 16, Details in der nachfolgenden Tabelle angegeben).

Abgeschlossene Schwangerschaftswoche	10	11	12	13	14 - 20
Median der MOMs in Schwangerschaften mit Down Syndrom	1,62	1,94	2,19	2,48	2,66

Werte sind Referenz 16 entnommen

Neben der Bestimmung des freien  $\beta$ -HCG müssen zur Risikoermittlung von Trisomie 21 weitere Parameter wie PAPP-A und die Nackentransparenz (NT) für das 1. Trimester und/oder AFP, freies Estriol und hCG im 2. Trimester bestimmt werden. Der Einsatz dieser Parameter für die Risikoberechnung erfordert eine spezielle Software.

**Gemäß der IVD Direktive 98/79/EG müssen sowohl die Software als auch die oben genannten zusätzlichen Testverfahren für die Ermittlung des Trisomie 21 Risikos geeignet - und durch eine benannte Stelle (Notified body) entsprechend CE-zertifiziert sein (angezeigt durch die Angabe der Nummer der benannten Stelle auf dem CE Symbol). Die Software muss die Berechnung von Medianen aus eigenen Messwerten unterstützen.**

Bei der Berechnung des Trisomie 21-Risikos mit der CE-konformen Software müssen unbedingt weitere Faktoren wie Alter der Frau, Gewicht, ethnische Zugehörigkeit und Raucherin/Nichtraucherin Berücksichtigung finden. **Da sich die Konzentrationen der für den Triple-Test eingesetzten Serumparameter während des Untersuchungszeitraumes ändern, kann eine Unterschätzung des Gestationsalters (Schwangerschaftsdauer) zu einem zu hoch eingeschätzten Risiko („Falsch Positiv“) führen.** Um diese Fehlerquelle zu reduzieren, ist es wichtig, das Gestationsalter so präzise wie möglich zu bestimmen. **Die Bestimmung des Gestationsalters aus der letzten Regelblutung ist mit einem hohen Variationsrisiko behaftet. Für eine möglichst genaue Bestimmung des Gestationsalters wird die sonographische Bestimmung der Scheitel-Steiss Länge (SSL) oder des Biparietaldurchmessers (BPD) empfohlen.**

Die Bestimmung von freiem  $\beta$ -hCG im Zuge eines Pränatalscreenings erlaubt lediglich die Ermittlung eines Risikos für Trisomie 21. Der Nachweis von Trisomie 21 kann nur über genetische Methoden erfolgen.

### 7.2 Konzentration an hCG und den freien Untereinheiten bei einem Schwangerschaftschoriokarzinom

Freie  $\alpha$ - und freie  $\beta$ -Untereinheiten und hCG-Konzentrationen wurden bei 5 Patienten mit unbehandeltem Schwangerschaftschoriokarzinom gemessen. Die folgende Tabelle zeigt die Konzentrationen im Serum.

Patient Nummer	hCG (ng/mL)	Freies $\alpha$ -hCG (ng/mL)	Freies $\beta$ -hCG (ng/mL)
1	210000	112	8000
2	22195	20	1300
3	6840	1	232
4	36000	44	3900
5	4200	2	350

Die Konzentration an freiem  $\alpha$ -hCG war gering, im Bereich von 1 ng/mL bis 112 ng/mL. Die hCG-Konzentration hingegen lag im Bereich von 4200 ng/mL bis 210000 ng/mL (1 ng  $\approx$  15 mIU).

Im Gegensatz dazu wurde die Konzentration an freiem  $\beta$ -hCG bei einem Choriokarzinom deutlich erhöht gefunden.

### 7.3 Ektopische Production von hCG und der freien Untereinheiten in nicht-trophoblastischen Tumoren

Die folgende Tabelle zeigt Ergebnisse bei verschiedenen Tumoren und Kontrollgruppen mit gutartigen Erkrankungen und Gesunden. Messung von hCG,  $\alpha$ -hCG, und  $\beta$ -hCG-Serumkonzentrationen in nicht-trophoblastischen Tumoren, gutartigen Erkrankungen und Gesunden.

Art des Tumors	Anzahl der Proben	hCG (ng/mL)	$\alpha$ -hCG (ng/mL)	$\beta$ -hCG (ng/mL)
Zervix	20	0	1 (1,6) <sup>a</sup>	1 (0,65)
Corpus uterus	20	0	0	0
Magen	20	0	0	1 (1,5)
Pankreas	20	0	1 (16,0)	2 (0,8, 3,1)
Darm	20	0	0	0
Lunge	20	0	1 (90,0)	1 (0,7)
Ovar	20	0	1 (1,8)	0
Prostata	20	0	1 (1,6)	0
Andere Tumore des Verdauungstraktes	18	0	0	0
Total [%]	178	0	5 [3]	5 [3]
Kontrollgruppen mit gutartigen Erkrankungen	61	0	1 (1,6)	0
Kontrollgruppen mit Gesunden	50	0	0	0
Total [%]	111	0	1 [1]	0

<sup>a</sup> Die Zahl in Klammern gibt den Messwert in ng/mL an.

Der Cut-off-Wert für positive Ergebnisse liegt bei 1,5 ng/mL für hCG und  $\alpha$ -hCG und 0,4 ng/mL für  $\beta$ -hCG.

Verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe hatten alle Patienten mit nicht-trophoblastischen Tumoren hCG-Konzentrationen im Normalbereich ( $\sim 0,9$  ng/mL). Freie Untereinheiten waren erhöht bei 10 von 178 Patienten. Es ist anzumerken, dass bei 2 Patienten (Pankreas- und Lungentumor) die  $\alpha$ -hCG-Werte relativ hoch lagen (16 ng/mL bzw. 90 ng/mL), während die höchste Konzentration an freiem  $\beta$ -hCG nur bei 3,1 ng/mL lag (Pankreastumor).

## 8 QUALITÄTS-KONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden. Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden. Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern. Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden. In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

## 9 ASSAY CHARACTERISTIKA

### 9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0.2 – 200 ng/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 Zero Buffer (n = 20), beträgt 0,2 ng/mL.

Die Daten zu:

### 9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

### 9.5 Wiederfindung

### 9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

## 10 GRENZEN DES TESTS

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

### 10.1 Interferenzen

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0.125 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 freien  $\beta$ -hCG-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

### 10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook Effekt tritt bei Proben mit bis zu 19800 ng/mL an freiem  $\beta$ -HCG nicht auf.

## 11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

### 11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

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

### 11.2 Therapeutische Konsequenzen

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

### 11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2 erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

## 12 REFERENZEN / LITERATUR

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

## 1 INTRODUZIONE

Il test immuno-enzimatico **Free  $\beta$ -HCG ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa di  $\beta$ -HCG libero in siero e EDTA plasma. **Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.** La determinazione di  $\beta$ -HCG libero nel primo trimestre di gravidanza e' stata riportata come un marker utile per il screening prenatale per la Sindrome di Down e altre aneuploidie fetali. Valori elevati di  $\beta$ -HCG libero in combinazione con l'età materna, la misura di PAPP-A e la determinazione ultrasonica della translucenza nucale (NT) nella settimana 11 a 14 di gravidanza permettono di individuare fino a 90 % delle gravidanze con sindrome di Down (referenza 15). **Il test Free  $\beta$ -HCG ELISA DE4718 può essere usato per la determinazione del rischio per la sindrome di Down (trisomia 21) nel primo trimestre di gravidanza. Per la determinazione del rischio di trisomia 21 e di altre aneuploidie fetali, il  $\beta$ -HCG libero dovrebbe sempre essere determinato in combinazione con altri analiti (per esempio PAPP-A e NT, vedi sopra) e usando una software speciale per la valutazione del rischio di trisomia 21. In accordo con le direttive IVD (98/79/EC), la software e i test kit per analiti aggiuntivi devono essere idonei per il screening di trisomia 21 e certificati CE da un ente responsabile, indicando il numero di identificazione sul timbro CE su software e test kits.**

## 2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test kit Free  $\beta$ -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  $\beta$ -HCG libero. Un'aliquota di un campione di paziente contenente  $\beta$ -HCG libero endogeno viene incubato nel pozzetto ricoperto dell'enzima coniugato, che è un anticorpo anti- $\beta$ -HCG 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  $\beta$ -HCG libero nel campione. Dopo l'aggiunta della soluzione substrato l'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di  $\beta$ -HCG libero nel campione del paziente.

## 3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.
- Informazioni su sostanze pericolose contenute nel kit sono riportate nel regolamento di sicurezza.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la Stop Solution dovrebbe essere evitato perché contiene 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati 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 Demeditec 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- $\beta$ -HCG anticorpo (monoclonale)
2. **CAL 0 – 5 LYO Standard (Standard 0-5)**, 6 flaconi (liofilizzati), 1,0 mL; Concentrazione: 0 – 10,0 – 25,0 – 50,0 – 100,0 – 200,0 ng/mL; Gli standard sono calibrati contro materiale di riferimento internazionale approvato dal WHO Human Chorionic Gonadotrophin, Beta Subunit (Purified) (NIBSC code: 99/650). Conversione: 1 mIU = 1 ng. Vedi "preparazione dei reagenti". Contiene conservante senza mercurio.
3. **CONTROL low & high LYO Control Low & High** (Controlli), 2 flaconi (liofilizzati), 1,0 mL. vedi „preparazione dei reagenti“. I valori dei controlli sono indicati sull'etichetta dei flaconi o sulla descrizione QC. Contiene conservante senza mercurio.
4. **SAM DIL Zero Buffer**, 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso. Contiene conservante senza mercurio.
5. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate** (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 18 mL, pronto all'uso. Anti- $\beta$ -HCG anticorpo coniugato alla perossidasi di rafano.
6. **SUB TMB Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; TMB (benzidine tetrametilico).
7. **STOP SOLN Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; contiene 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
8. **WASH SOLN 40x Wash Solution** (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (concentrata 40X); vedi „preparazione dei reagenti“.

### 4.2 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450  $\pm$ 10 nm)
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile.
- Un incubatore regolabile a 37 °C
- Carta assorbente.
- Acqua distillata.

### 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. Test kits aperti rimangono attivi per 4 settimane se magazzinati alle condizioni sopra descritte.

### 4.4 Preparazione dei reagenti

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

#### Standard

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 30 giorni a 2 °C a 8 °C. Per periodi più lunghi congelare a -20 °C

#### Control

Ricostituire il contenuto liofilizzato con 1,0 mL acqua distillata e far riposare per almeno 10 minuti. Mescolare alcune volte prima dell'uso. **Nota:** Il controllo ricostituito è stabile per 30 giorni da 2 °C a 8 °C. Per periodi più lunghi congelare a -20 °C

#### Wash Solution

Diluire 30 mL Wash Solution concentrata con 1170 mL di acqua deionizzata fino ad un volume finale di 1200 mL. La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 2 settimane a temperatura ambiente.

#### 4.5 Smaltimento del kit

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

#### 4.6 Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta 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 EDTA plasma può essere usato per questo test. Non usare campioni emolitici, itterici o lipemici. Attenzione: Se i campioni contengono sodio azide non devono essere utilizzati per questo test.

#### 5.1 Collezione dei campioni

##### Siero:

Collezionare sangue tramite puntura venale (p.es. Sarstedt Monovette per siero), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente. Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti con una terapia anticoagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

##### EDTA plasma:

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

#### 5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere magazzinati ben chiusi fino a 24 ore a 2 °C 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 è trovata una concentrazione oltre lo standard più alto, questo campione può essere diluito con Zero Buffer e nuovamente determinato. Della diluizione deve essere però tenuto conto.

##### Esempio:

- a) diluizione 1:10: 10 µL campione + 90 µL Zero Buffer (agitare bene)
- b) diluizione 1:100: 10 µL della diluizione a) + 90 µL Zero Buffer (agitare bene).

### 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 Eseguiamo del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Pipettare **50 µL** di ogni **Standard, Control e campione** nei pozzetti, cambiando ogni volta la punta monouso.
3. Pipettare **100 µL Zero buffer** in ogni pozzetto.  
Agitare bene per 10 secondi. È molto importante raggiungere un completo mescolamento.
4. Incubare per **30 minuti** a 37 °C.
5. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.  
Lavare i pozzetti **5 volte** con Wash Solution diluita (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 eseguiamo del lavaggio!

6. Pipettare **150 µL Enzyme Conjugate** in ogni pozzetto.  
Agitare bene per 10 secondi. È molto importante raggiungere un completo mescolamento.
7. Incubare per **30 minuti** a 37 °C.
8. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.  
Lavare i pozzetti **5 volte** con Wash Solution diluita (400 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
9. Aggiungere **100 µL della Substrate Solution** ad ogni pozzetto.
10. Incubare per **20 minuti** a temperatura ambiente.
11. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **100 µL della Stop Solution** ad ogni pozzetto.
12. Determinare la densità ottica a **450 ± 10 nm** con un fotometro per microtiter-piastre **entro 10 minuti** dopo l'aggiunta della Stop Solution.

## 6.3 Rilevamento dei risultati

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

### 6.3.1 Esempio di una curva standard tipica

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

Standard	Densità ottiche (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	0,02
Standard 1 (10.0 ng/mL)	0,22
Standard 2 (25.0 ng/mL)	0,46
Standard 3 (50.0 ng/mL)	0,81
Standard 4 (100.0 ng/mL)	1,28
Standard 5 (200.0 ng/mL)	1,97



## 7 VALORI NORMALI

Si raccomanda fortemente che ogni laboratorio determini i propri valori normali e anormali. I risultati solamente non devono causare alcune conseguenze terapeutiche. I risultati devono essere correlate a alter osservazioni cliniche e a test diagnostici.

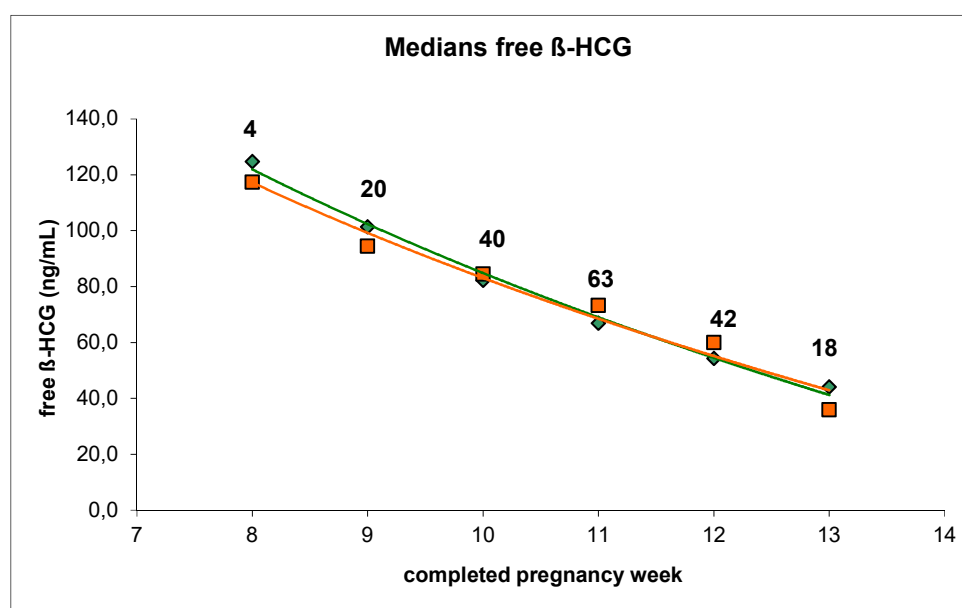
**NOTA:** Tutti i valori / le mediane in questo capitolo sono stati determinati nel siero.

### 7.1 Livelli normali della subunità $\beta$ -hCG libera nella gravidanza

187 campioni di donne nel primo trimestre di gravidanza sono stati analizzati con il Free  $\beta$ -HCG ELISA. Usando un grafico semi.logaritmico, le seguenti equazioni di regressione sono state trovate:

$$\text{Mediana di } \beta\text{-HCG libero} = \text{EXP}(6.579 - 0.0297 * \text{giorno di gestazione}).$$

Nel seguente diagramma e nella tabella le mediane per le **settimane di gravidanza 8 a 13 complete** sono state calcolate. Per la comparazione le mediane sono state calcolate anche manualmente (mediane per settimana).



Settimana di gravidanza	Giorno di gestazione	Mediana dalla equazione di regressione [ng/mL]	Mediana della settimana [ng/mL]
8	59	124.8	117.4
9	66	101.4	94.6
10	73	82.3	84.6
11	80	66.9	73.4
12	87	54.3	60.1
13	94	44.1	36.0

Differenze tra popolazioni e laboratory possono portare a valori mediani leggermente diversi. Ogni laboratorio deve determinare e continuamente aggiornare i propri valori mediani dal proprio pool di pazienti. L'equazione di regressione e i valori nella tabella devono servire soltanto come valori guida. Il calcolo dei mediani e/o delle funzioni di regressioni per il calcolo dei mediani da dati di pazienti propri dovrebbe essere eseguito usando un software per la valutazione di rischio di trisomia 21. I mediani determinati per il free  $\beta$ -HCG ELISA non possono essere usati per i test prodotti da altri produttori. I mediani determinati con test di free  $\beta$ -HCG di altri produttori non possono essere usati per il free  $\beta$ -HCG ELISA.

### 7.1.1 L'uso dello screening per la sindrome di Down

Per il calcolo del rischio nel screening prenatale, le concentrazioni di  $\beta$ -HCG libere sono indicati come MOM (multipli dei mediani, MOM = Concentrazione misurata di  $\beta$ -HCG libere / Mediano  $\beta$ -HCG libere). Nelle gravidanze con la sindrome di Down, le mediane di MOMs per  $\beta$ -HCG libero aumentano durante il primo e secondo trimestre (riferimento 16, dettagli vedi tabella).

Settimana completata di gravidanza	10	11	12	13	14-20
Mediano di MOM in gravidanze con syndrome di Down	1,62	1,94	2,19	2,48	2,66

Data da nota bibliografica 16

Per il calcolo del rischio di trisomia 21 non soltanto il  $\beta$ -HCG libere, ma anche altri parametric come PAPP-A e la translucenza nucale (NT) per il primo trimestre e/o AFP, estriolo libero e HCG per il secondo trimestre devono essere determinati. L'uso di questi parametri per il calcolo del rischio di trisomia 21 richiede una software speciale.

**In accordo con le direttive IVD (98/79/EC), la software e i test kit per analiti aggiuntivi devono essere idonei per il screening di trisomia 21 e certificati CE da un ente responsabile, indicando il numero di identificazione sul timbro CE su software e test kits. La software deve permettere di calcolare i mediani da dati propri di pazienti.**

E' obbligatorio di prendere in considerazione fattori aggiuntivi, p.es. l'età delle donne, il peso, il gruppo etnico e il fatto di essere fumatrice/non-fumatrice. **Una sottostima della durata di gestazione può portare a un rischio calcolato falsamente alto (falsi positivi).** Per ridurre i fonti di errore, è importante **determinare la durata della gestazione più precisamente possibile. La durata di gestazione calcolata dall'ultimo ciclo mestruale porta inerentemente un alto rischio di variazione.** Si raccomanda **la determinazione sonografica della lunghezza crown-rump (CRL) o del parametro biparietale (BIP)** per la determinazione accurata della durata di gestazione.

La misura di  $\beta$ -HCG libere nel corso di un screening prenatale determina il rischio di trisomia 21 soltanto. Per la prova di trisomia 21, si richiede la determinazione genetica.

### 7.2 Livelli di hCG e di subunità liberi nel coriocarcinoma gestazionale

Livelli di subunità a e b liberi e di hCG sono stati misurati in cinque pazienti con coriocarcinoma gestazionale non trattato. Le concentrazioni nel siero sono riportati nella seguente tabella.

Patient Number	hCG (ng/mL)	Free $\alpha$ -hCG (ng/mL)	Free $\beta$ -hCG (ng/mL)
1	210000	112	8000
2	22195	20	1300
3	6840	1	232
4	36000	44	3900
5	4200	2	350

I livelli di  $\alpha$ -hCG libero erano bassi, in un campo tra 1 ng/mL -112 ng/mL, mentre i livelli di hCG erano nel campo tra 4200 ng/mL to 210000 ng/mL (1 ng  $\approx$  15 mIU). Al contrario, le concentrazioni di  $\beta$ -hCG libero erano significativamente elevati in casi di coriocarcinoma.

**7.3 Produzione extrauterina di hCG e delle subunità libere da tumori non-trofoblastici**

La seguente tabella mostra i risultati ottenuti per tumori vari e per controlli sani e malati benigni: La determinazione dei livelli nel siero di hCG,  $\alpha$ -hCG e  $\beta$ -hCG in tumori non-trofoblastici, malati benigni e controlli sani.

Tipo di tumour	No. di campioni	hCG (ng/mL)	$\alpha$ -hCG (ng/mL)	$\beta$ -hCG (ng/mL)
Cervice	20	0	1 (1.6) <sup>a</sup>	1 (0.65)
Corpo uterino	20	0	0	0
Gastrico	20	0	0	1 (1.5)
Pancreatico	20	0	1 (16.0)	2 (0.8, 3.1)
Colon	20	0	0	0
Polmoni	20	0	1 (90.0)	1 (0.7)
Ovarico	20	0	1 (1.8)	0
Prostate	20	0	1 (1.6)	0
Altri tumori del tratto digestive	18	0	0	0
Totale [%]	178	0	5 [3]	5 [3]
Controlli di malattie benigni	61	0	1 (1.6)	0
Controlli sani	50	0	0	0
Total [%]	111	0	1 [1]	0

<sup>a</sup> T a Il numero tra parentesi rappresenta il valore misurato in ng/mL.

Il valore limite per risultati positivi sono 1.5 ng/mL per hCG e  $\alpha$ -hCG e 0.4 ng/mL per  $\beta$ -hCG.

Comparato con livelli in controlli sani, tutti i pazienti con neoplasie non-trofoblastici avevano concentrazioni di hCG entro il campo normale (~ 0.9 ng/mL). Le subunità libere erano elevate in 10 di 178 pazienti. E' da notare che i livelli di  $\alpha$ -hCG determinati per due pazienti (tumore pancreatico e polmonare) erano relativamente alti (16 e 90 ng/mL, rispettivamente), mentre la concentrazione massima per  $\beta$ -hCG libero era soltanto 3.1 ng/mL (tumore pancreatico).

**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 0,2 – 200 ng/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 Zero Buffer ed erano 0,2 ng/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 0,125 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  $\beta$ -HCG libero nel campione.

### 10.3 Effetto Hook di alti dosaggi

Nessun effetto hook (di agglomerazione) è stato osservato in questo test fino a 19800 ng/mL di  $\beta$ -HCG libero.

## 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 reclamo, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

## 12 BIBLIOGRAFIA

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

## 1 INTRODUCCIÓN

El **Kit de inmunoensayo enzimático Free  $\beta$  HCG** proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del  $\beta$ -hCG libre en suero y plasma EDTA.

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

## 2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit Free  $\beta$  HCG ELISA es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el principio del sándwich. Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo monoclonal/policlonal dirigido contra un único foci antigénico en una molécula de  $\beta$ -hCG libre. Se incubaba una alícuota de una muestra perteneciente a un paciente que contiene  $\beta$ -hCG libre endógena en los pocillos recubiertos con el enzima conjugado, que es un anticuerpo anti- $\beta$ -hCG conjugado con la peroxidasa endógena. Después de la incubación se lava el conjugado que no se ha unido. La cantidad de peroxidasa unida es proporcional a la concentración de  $\beta$ -hCG libre en la muestra. Cuando se añade la solución del sustrato de la peroxidasa, la intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de  $\beta$ -hCG libre 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 metodico técnico 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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- $\beta$ -hCG (monoclonal).
2. **CAL 0 – 5 LYO Standard (Standard 0-5)**, (Estándar), 6 viales (liofilizados), 1,0 mL; Concentraciones: 0 – 10.0 – 25.0 – 50.0 – 100.0 – 200.0 ng/mL. Los estándares están calibrados según el material de referencia WHO Reference Reagent Human Chorionic Gonadotrophin, Beta Subunit (Purified) (NIBSC code: 99/650). Conversión: 1 mIU = 1 ng. Ver “Preparación de los Reactivos”; Contiene conservante sin mercurio.
3. **CONTROL low & high LYO Control (Low and high)**, 2 viales (liofilizado), 1,0 mL, ver “Preparación de los Reactivos”. Referir los valores y rangos del control a la etiqueta del vial o a la Hoja de datos QC. Contiene conservante sin mercurio.
4. **SAM DIL Zero Buffer**, 1 vial, 14 mL, listo para usar, Contiene conservante sin mercurio.
5. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático), 1 vial, 18 mL, listo para usar, Anticuerpo anti-  $\beta$ -hCG conjugado con la Peroxidasa de rábano; Contiene conservante sin mercurio.
6. **SUB TMB Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 14 mL, listo para usar, Tetrametilbencidina (TMB).
7. **STOP SOLN Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar, contiene 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en al piel.
8. **WASH SOLN 40x Wash Solution** (Solución de lavado), 1 vial, 30 mL (concentrado 40X), ver “Preparación de los Reactivos”.

### 4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450 ±10 nm)
- Micropipetas de precisión variable calibradas.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.
- Una incubadora para incubación a 37 °C

### 4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2 °C – 8 °C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha. Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 °C – 8 °C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2 °C – 8 °C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo. Los kits abiertos conservan su actividad durante 4 semanas si se almacenan como se ha descrito arriba.

### 4.4 Preparación de los Reactivos

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

#### Standards

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 30 días a 2 °C - 8 °C. Para períodos más largos congelar a -20 °C.

#### Control

Reconstituir el contenido liofilizado con 1,0 mL de agua destilada y dejar reposar como mínimo durante 10 minutos. Mezclar varias veces antes de usar. **Nota:** El control reconstituido es estable durante 30 días a 2 °C – 8 °C. Para períodos más largos congelar a -20 °C.

#### Wash Solution

Mezclar 30 mL de Wash Solution concentrada con 1170 mL de agua desionizada hasta un volumen final de 1200 mL. La solución del lavado diluida es estable durante 2 semanas a temperatura ambiente.

#### 4.5 Eliminación del Kit

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

#### 4.6 Kits de ensayo dañados

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

### 5 MUESTRAS

En este ensayo pueden usarse suero o plasma EDTA. No usar muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas. Tener en cuenta: No deben usarse muestras que contengan acida sódica.

#### 5.1 Toma de muestras

##### Suero:

Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette 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 EDTA (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 24 horas a 2 °C a 8 °C antes del ensayo. Las muestras almacenadas por un período de tiempo más largo han de congelarse sólo una vez a -20 °C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

#### 5.3 Dilución de las muestras

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el estándar más concentrado, ha de diluirse con Zero Buffer 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 Zero Buffer (mezclar totalmente)
- b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL Zero Buffer (mezclar totalmente).

### 6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

#### 6.1 Consideraciones generales

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

## 6.2 Procedimiento de ensayo

Cada uno debe incluir una curva de estándares.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **50 µL** de cada **Standard, Control y muestras** con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Dispensar **100 µL** de **Zero Buffer** a cada pocillo.  
Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
4. Incubar durante **30 minutos** a 37 °C.
5. Sacudir energicamente el contenido de los pocillos.  
Lavar los pocillos **5 veces** con Wash Solution diluida (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. Dispensar **150 µL** de **Enzyme Conjugate** a cada pocillo.
7. Incubar durante **30 minutos** a 37 °C.
8. Sacudir energicamente el contenido de los pocillos.  
Lavar los pocillos **5 veces** con Wash Solution diluida (300 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
9. Adicionar **100 µL** de **Substrate Solution** a cada pocillo.
10. Incubar durante **20 minutos** a temperatura ambiente.
11. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **100 µL** de **Stop Solution** a cada pocillo.
12. Leer la OD a **450 ±10 nm** con un lector de microplacas **dentro de los 10 minutos** después de la adición de la Stop Solution.

## 6.3 Cálculo de los Resultados

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

### 6.3.1 Ejemplo de una Curva Estándar Típica

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

Estándar	Unidades Ópticas (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	0.02
Standard 1 (10.0 ng/mL)	0.22
Standard 2 (25.0 ng/mL)	0.46
Standard 3 (50.0 ng/mL)	0.81
Standard 4 (100.0 ng/mL)	1.28
Standard 5 (200.0 ng/mL)	1.97



## 7 VALORES ESPERADOS

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio debe determinar sus propios valores normales y anormales. Los resultados por si solos no deben ser la única razón para cualquier consecuencia terapéutica. Los resultados deben correlacionarse con otras observaciones clínicas y test de diagnóstico.

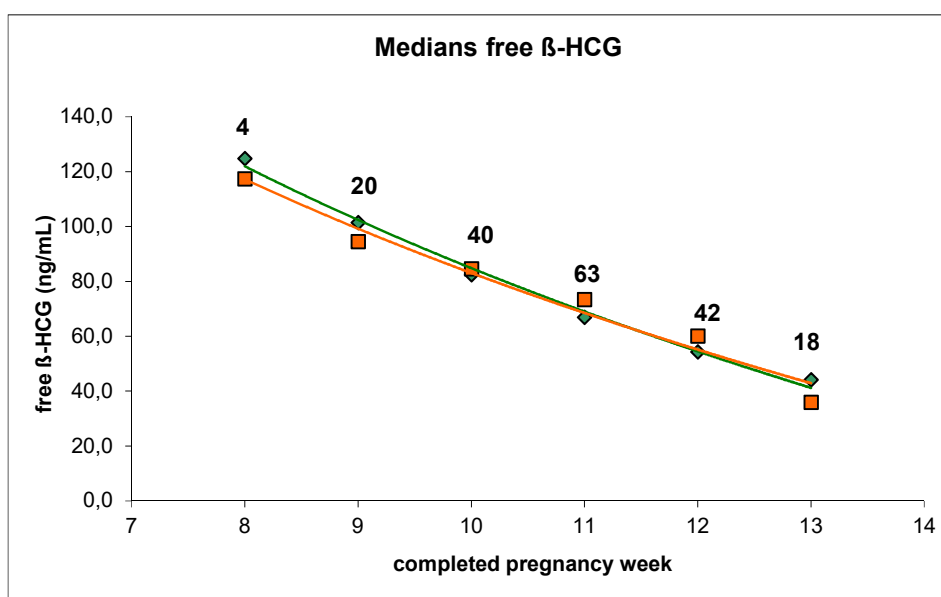
**NOTA:** Todos los valores/medianas en este capítulo han sido determinados en el suero.

### 7.1 Niveles de subunidades libres de $\beta$ -hCG en embarazo normal

187 muestras de mujeres embarazadas en el primer trimestre han sido analizadas con el Free  $\beta$ -HCG ELISA. Usando una escala semi-logarítmica, se obtuvo la siguiente ecuación de regresión:

$$\text{Mediana de } \beta\text{-HCG libre} = \text{EXP}(6.579 - 0.0297 * \text{día de gestación}).$$

En el siguiente diagrama y tabla, las medianas para **semanas completadas 8 a 13 del embarazo (completed pregnancy weeks)** han sido calculadas. De forma comparativa, las medianas fueron también calculadas manualmente (mediana de la semana).



Semana de embarazo	Día de gestación	Mediana de la ecuación de regresión [ng/mL]	Mediana de la semana [ng/mL]
8	59	124.8	117.4
9	66	101.4	94.6
10	73	82.3	84.6
11	80	66.9	73.4
12	87	54.3	60.1
13	94	44.1	36.0

Diferencias en la población y el laboratorio pueden llevar a ligeras diferencias en las medianas. Cada laboratorio debe pues determinar y actualizar continuamente sus propias medianas de su colectivo de pacientes. Las ecuaciones de regresión y los valores de la tabla deben utilizarse solo como una directriz. El cálculo de las medianas y/o las funciones de regresión para el cálculo de las medianas de las bases de datos de sus propios pacientes deben realizarse con el software aplicado para cálculo del riesgo de la trisomía del 21. Las medianas determinadas por el free  $\beta$ -HCG ELISA no pueden ser utilizadas con ensayos de otros fabricantes. Las medianas determinadas por lo ensayos free  $\beta$ -HCG de otros fabricantes no pueden utilizarse con el free  $\beta$ -HCG ELISA.

### 7.1.1 Uso para Prueba de Síndrome de Down

Para calcular el riesgo en una prueba prenatal, las concentraciones de  $\beta$ -HCG libre se indican como MOM (múltiplos de la mediana, MOM = Concentración medida ( $\beta$ -HCG libre) / Mediana de  $\beta$ -HCG libre). En embarazos con Síndrome de Down la mediana de MOMs para  $\beta$ -HCG libre aumenta durante el primer y segundo trimestres (referencia 16, para más detalles ver tabla).

Semanas completadas del embarazo	10	11	12	13	14 - 20
Mediana de MOM en embarazos con Síndrome de Down	1,62	1,94	2,19	2,48	2,66

Datos de la referencia 6

Para el cálculo del riesgo de la trisomía del 21 se deben determinar además de  $\beta$ -HCG libre otros parámetros como PAPP-A y la translucidez de la nuca (TN) para el primer trimestre y/o AFP, estriol libre y HCG para el Segundo trimestre. El uso de estos parámetros para el cálculo de la trisomía del 21 requiere un software especial. **De acuerdo con la directiva IVD (98/79/EC) tanto el software como los kits para los análisis adicionales deben ser adecuados para el análisis de la trisomía 21 y certificados por la Comisión Europea por un Organismo notificado, indicado por el número de identificación del Organismo notificado en la marca de la comisión europea en el software y en los kits. El software debe permitir el cálculo de las medianas para las medidas de los pacientes propios.**

Es imperativo el tener en consideración factores adicionales, por ejemplo, edad de la mujer, peso, grupo étnico y ser fumadora/no fumadora. **Una subestimación de la edad de gestación puede llevar a un cálculo de alto riesgo falso (falso positivo).** Para reducir la fuente de este error, es importante **determinar la edad de gestación lo más precisamente posible. El cálculo de la edad de gestación del último ciclo menstrual agrega un alto riesgo de variación.** Se recomienda la **determinación sonográfica de la longitud cefalococcígea (CRL) o el diámetro biparietal (BIP)** para la determinación adecuada de la edad de gestación. La medida de  $\beta$ -HCG libre en el curso de una búsqueda prenatal determina solamente un riesgo para la trisomía del 21. Para probar la trisomía del 21 se requiere la determinación genética.

### 7.2 Niveles de hCG y subunidades libres en coriocarcinoma gestacional

Se midieron los niveles de las subunidades libres a y b y de hCG en cinco pacientes con coriocarcinoma no tratado. Las concentraciones en el suero se muestran en la siguiente tabla

Patient Number	hCG (ng/mL)	Free $\alpha$ -hCG (ng/mL)	Free $\beta$ -hCG (ng/mL)
1	210000	112	8000
2	22195	20	1300
3	6840	1	232
4	36000	44	3900
5	4200	2	350

Los niveles de  $\alpha$ -hCG fueron bajos, entre 1 ng/mL - 112 ng/mL, mientras que los niveles de hCG estaban entre 4200 ng/mL a 210000 ng/mL (1 ng  $\approx$  15 mIU). Por el contrario, las concentraciones de  $\beta$ -hCG libre se encontraron marcadamente elevadas en coriocarcinoma.

### 7.3 Producción ectópica de hCG y subunidades libres por tumores no trofoblásticos

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos en varios tumores y en controles sanos y con enfermedades benignas: Medida de los niveles séricos de hCG,  $\alpha$ -hCG y  $\beta$ -hCG en tumores no trofoblásticos, enfermedades benignas y controles sanos.

Tipo de tumor	Número de muestras	hCG (ng/mL)	$\alpha$ -hCG (ng/mL)	$\beta$ -hCG (ng/mL)
Cervix	20	0	1 (1,6) <sup>a</sup>	1 (0,65)
Cuerpo del útero	20	0	0	0
Gástrico	20	0	0	1 (1,5)
Pancreático	20	0	1 (16,0)	2 (0,8, 3,1)
Colon	20	0	0	0
Pulmón	20	0	1 (90,0)	1 (0,7)
Ovario	20	0	1 (1,8)	0
Próstata	20	0	1 (1,6)	0
Otro tumor del tracto digestivo	18	0	0	0
Total [%]	178	0	5 [3]	5 [3]
Controles con enfermedades benignas	61	0	1 (1,6)	0
Controles sanos	50	0	0	0
Total [%]	111	0	1 [1]	0

<sup>a</sup> El número entre paréntesis representa el valor medido en ng/mL.

Los valores de corte para resultados positivos son 1,5 ng/mL para hCG y  $\alpha$ -hCG y 0,4 ng/mL para  $\beta$ -hCG.

Cuando se comparan con los controles sanos, los pacientes con cáncer no trofoblástico tienen concentraciones de hCG dentro de los valores normales (~ 0,9 ng/mL). Las subunidades libres estaban elevadas en 10 de 178 pacientes. Es digno de mención que los niveles de  $\alpha$ -hCG en dos pacientes (tumores pancreático y de pulmón) estaban relativamente altos (16 y 90 ng/mL, respectivamente), mientras que la concentración máxima de  $\beta$ -hCG libre fue solo de 3,1 ng/mL (tumor pancreático).

## 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 0,2 – 200 ng/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 Zero Buffer y resultó ser 0,2 ng/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 0,125 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  $\beta$ -hCG libre en una muestra.

### **10.3 Efecto Gancho-Dosis-Elevada**

No se ha observado efecto gancho en este ensayo hasta 19800 ng/mL de  $\beta$ -hCG libre.

## **11 ASPECTOS LEGALES**

### **11.1 Fiabilidad de los Resultados**

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

### **11.2 Consecuencias Terapéuticas**

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

### **11.3 Responsabilidad**

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












## **12 REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA**

Consultar el manual de usuario en inglés.





## 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 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
<i>Distributed by</i>	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