



DCM014-13

Ed. 03/2024

b-HCG ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta della β -HCG nel siero o plasma umano

IVD

LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C

 $\Sigma = 96$ test

REF DKO014

1. SCOPO PREVISTO

Per uso diagnostico *in vitro*

Per uso professionale in laboratorio

HCG ELISA è un dispositivo diagnostico manuale *in vitro* destinato alla determinazione quantitativa di gonadotropina corionica umana (hCG) nel siero o nel plasma umano di una popolazione adulta.

2. SIGNIFICATO CLINICO

L'HCG è un ormone glicoproteico secreto in gravidanza, è sintetizzato dall'embrione subito dopo il concepimento e successivamente dalla placenta. Il ruolo è di impedire la disintegrazione del corpus luteum dell'ovaia e quindi di favorire la sintesi di progesterone che è una condizione critica per la gravidanza negli esseri umani. L'HCG ha ulteriori funzioni, ad esempio è coinvolto nell'immuno-tolleranza della gravidanza.

La verifica, durante la gravidanza, dei livelli di HCG nel sangue o nell'urina indica la presenza o l'assenza di un embrione impiantato. In particolare, i test di gravidanza impiegano un anticorpo che è specifico per l'unità β di HCG (β -HCG). Ciò è importante in modo che le prove non generino falsi positivi con LH e FSH.

Il β -HCG è secreto da alcune cellule cancerose come ad esempio il teratoma e il coriocarcinoma. Ma, livelli elevati non possono dimostrare la presenza di un tumore e livelli bassi non lo escludono.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test HCG ELISA si basa sul legame simultaneo dell'HCG con due anticorpi monoclonali, uno immobilizzato sulla micropiastro specifico per la subunità β e l'altro coniugato con perossidasi di rafano (HRP), specifico per la subunità α .

Dopo l'incubazione, la separazione del legato dal libero viene eseguita con un semplice lavaggio della fase solida. Quindi, l'enzima HRP nella parte libera reagisce con il substrato (H_2O_2) e il substrato TMB e sviluppa un colore blu che cambia in giallo quando viene aggiunta la soluzione di arresto (H_2SO_4). L'intensità del colore è proporzionale alla concentrazione di HCG nel campione.

La concentrazione di HCG nel campione viene calcolata attraverso una curva di calibrazione.

4. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

4.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibratori (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

ProClin >0,0015%, BSA 1,4%

CAL0

REF DCE002/1406-0

CAL1

REF DCE002/1407-0

CAL2

REF DCE002/1408-0

CAL3

REF DCE002/1409-0

CAL4

REF DCE002/1410-0

CAL5

REF DCE002/1411-0

2. Controllo (1 flacone, 1 mL)

La concentrazione dei controlli è indicata sul certificato di analisi. ProClin >0,0015%, BSA 1,4%

REF DCE045/1403-0

3. Tampone Incubazione (1 flacone, 50 mL)

Tampone fosfato 50 mM pH 7.4, BSA 1 g/L. ProClin >0,0015%

REF DCE001/1401-0

4. Coniugato (1 flacone, 1 mL)Anticorpo monoclonale coniugato a perossidasi di rafano (HRP) diretto contro la subunità α -HCG. ProClin >0,0015% e BSA

REF DCE002/1402-0

5. Coated Microplate (1 micropiastro breakable)Anticorpo monoclonale adsorbito sulla micropiastro diretto contro la subunità β -HCG

REF DCE002/1403-0

6. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL) H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle), ProClin <0,0015%

REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido solforico 0,15M (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE005-0

8. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L. ProClin >0,0015%

REF DCE006-0

4.2. Materiali richiesti ma non forniti

Acqua distillata

4.3. Materiali e strumentazione ausiliari

Erogatore automatico

Pipette di precisione

Lettore di micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

5. AVVERTENZE

- Questo kit è destinato all'uso *in vitro* esclusivamente da parte di professionisti. Non per uso interno o esterno in esseri umani o animali.
- Utilizzare adeguati dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le buone prassi di laboratorio (GLP, Good Laboratory Practice) per la manipolazione di emoderivati.
-  Il materiale di origine animale utilizzato nella preparazione del kit è stato ottenuto da animali certificati come sani e la proteina bovina è stata ottenuta da Paesi non infettati dalla BSE, ma tali materiali devono essere trattati come potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti (calibratori, controllo, tampone incubazione, coniugato e soluzione di lavaggio) contengono piccole quantità di ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) come conservante. Evitare il contatto con pelle o mucose.
- Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]

Sensibilizzazione cutanea, categoria 1



Attenzione

Contiene: ProClin 300

Indicazioni di pericolo:

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P261 - Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi / proteggere gli occhi / proteggere il viso / proteggere l'udito.

P321 - Trattamento specifico (vedere istruzioni supplementari di pronto soccorso su questa etichetta).

P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: Consultare un medico.

P362+P364 - Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

6. PRECAUZIONI

- Attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi di pipettaggio forniti in questo protocollo. I dati sulle prestazioni qui rappresentati sono stati ottenuti utilizzando i reagenti specifici elencati in queste istruzioni per l'uso.
- Tutti i reagenti devono essere conservati refrigerati a 2-8 °C nel contenitore originale. Tutte le eccezioni sono chiaramente indicate.
- Lasciare che tutti i componenti del kit e i campioni raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) e mescolare bene prima dell'uso.
- Non scambiare i componenti di kit di lotti diversi. La data di scadenza stampata sulle etichette della confezione e delle fiale deve essere rispettata. Non utilizzare alcun componente del kit dopo la data di scadenza.

- Se si utilizzano apparecchiature automatizzate, l'utente ha la responsabilità di assicurarsi che il kit sia stato adeguatamente convalidato per il suo utilizzo/scopo previsto.
- La rimozione incompleta o imprecisa del liquido dai pozzetti potrebbe influenzare la precisione del dosaggio e/o aumentare il background. Per migliorare le prestazioni del kit sui sistemi automatici, si raccomanda di aumentare il numero di lavaggi.
- È importante che il tempo di reazione in ogni pozzetto sia mantenuto costante per ottenere risultati riproducibili. Il pipettaggio dei campioni non deve andare oltre i dieci minuti per evitare deviazioni del dosaggio. Se sono necessari più di 10 minuti, seguire lo stesso ordine di erogazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva dose-risposta in ogni piastra.
- L'aggiunta della soluzione di substrato TMB avvia una reazione cinetica, che viene terminata dall'aggiunta della soluzione di arresto. Pertanto, il substrato TMB e la soluzione di arresto devono essere aggiunti nella stessa sequenza per eliminare qualsiasi deviazione temporale durante la reazione.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori medici analizzando i controlli e/o i sieri in pool.
- La massima precisione è richiesta per la ricostituzione e l'erogazione dei reagenti.
- I campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici, itterici o emolizzati non devono essere utilizzati nel dosaggio.
- I lettori di piastre misurano verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.
- Quando si pipettano i reagenti del dosaggio, compresi campioni, calibratori e controlli, è necessario utilizzare puntali monouso nuovi per ridurre il rischio di contaminazione da carryover. In caso contrario, i risultati potrebbero non essere validi.

7. CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Conservare il kit a 2-8 °C, al buio.

- Il kit è stabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta esterna del kit.
- Una volta aperto, i calibratori sono stabili a 2-8 °C per 6 mesi.
- La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 30 giorni a 2-8 °C.

Nota importante: aprire il sacchetto contenente la micropiastra rivestita solo quando è a temperatura ambiente e chiuderlo immediatamente dopo l'uso.

8. RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio deve essere effettuato su campioni di siero o plasma.

Conservazione dei campioni	Durata
2-8 °C	2 giorni
Cicli di congelamento/scongelamento	1 ciclo

9. PROCEDURA

9.1. Preparazione di calibratori e controlli

Prima dell'uso, miscelare delicatamente per 5 minuti con un miscelatore a rotazione. I Calibratori sono pronti all'uso, sono calibrati contro il WHO 1st IRP 75/537 ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
mIU/mL	0	1	5	20	100	400

I controlli sono pronti per l'uso; la concentrazione del controllo è stampata sull'etichetta.

9.2. Preparazione del coniugato

Preparare immediatamente prima dell'uso.

Aggiungere 10 µL di Conjugate (reattivo 4) a 1 mL di Incubation Buffer (reattivo 3). La quantità di coniugato da preparare è proporzionale al numero dei test.

Mescolare delicatamente lasciando almeno 10 minuti su agitatore rotante. Stabile per almeno 3 ore a temperatura ambiente (22-28°C).

9.3. Preparazione della soluzione di lavaggio

Diluire il contenuto della fiala "Soluzione di lavaggio conc. 50X" con acqua distillata fino a un volume finale di 1000 mL prima dell'uso. Per i volumi più piccoli, rispettare il rapporto di diluizione 1:50.

È possibile osservare la presenza di cristalli all'interno della soluzione di lavaggio concentrata; in tal caso, mescolare a temperatura ambiente fino alla completa dissoluzione dei cristalli. Per una maggiore precisione, diluire l'intero flacone di soluzione di lavaggio concentrata a 1000 mL, avendo cura anche di trasferire completamente i cristalli sciacquando il flacone, quindi mescolare fino a quando i cristalli non si dissolvono completamente.

9.4. Preparazione dei campioni

La determinazione della β -HCG si effettua su siero o plasma umano.

I campioni a digiuno non sono necessari e non sono richieste preparazioni speciali dei campioni.

Raccogliere il sangue mediante puntura venosa in contenitori vacutainer e separare il siero (dopo la formazione del coagulo) o il plasma dalle cellule mediante centrifugazione.

Conservare il campione a -20 °C se la determinazione non viene eseguita lo stesso giorno della raccolta del campione. Prima dell'uso, miscelare delicatamente per 5 minuti con un miscelatore a rotazione.

9.5. Procedura

- **Lasciare che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) per almeno 30 minuti.** Alla fine del dosaggio, conservare immediatamente i reagenti a 2-8 °C: evitare una lunga esposizione a temperatura ambiente.
- Le strisce di micropozzetti rivestiti non utilizzate devono essere rilasciate in modo sicuro nella busta di alluminio contenente l'essiccante e conservate a 2-8 °C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche, i reagenti inutilizzati non devono mai essere trasferiti nelle fiale originali.

- Poiché è necessario eseguire la determinazione in duplicato per migliorare la precisione dei risultati del test, preparare due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni controllo, due per ogni campione, uno per il bianco.

Reagente	Calibratore	Campione/ Controlli	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₅	25 µL		
Campione / Controlli		25 µL	
Coniugato Diluito	100 µL	100 µL	
Incubare per 1 ora a temperatura ambiente (22- 28 °C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita. Nota importante: durante ogni fase di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e rimuovere la soluzione in eccesso picchiando la piastra capovolta su un tovagliolo di carta assorbente. Lavatore automatico: se si utilizzano apparecchiature automatiche, lavare i pozzetti almeno 5 volte.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare per 15 minuti, al buio, a temperatura ambiente (22-28 °C).			
Soluzione di arresto	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm o contro il bianco entro 5 minuti.			

10. CONTROLLO QUALITÀ

Le buone prassi di laboratorio (GLP) richiedono l'inclusione di campioni per il controllo della qualità in ogni serie di dosaggi al fine di verificare le prestazioni del dosaggio. I controlli devono essere trattati come campioni sconosciuti e i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati.

I controlli forniti nel kit devono essere testati come se fossero sconosciuti e hanno lo scopo di agevolare la valutazione della validità dei risultati ottenuti in ogni piastra di dosaggio.

La concentrazione media di ciascun livello di controllo è documentata nel rapporto del controllo di qualità incluso in ciascun kit. Tali livelli di concentrazione media sono determinati in base a diversi dosaggi eseguiti in duplicato in più posizioni su ciascuna piastra.

DiaMetra raccomanda agli utenti di conservare le annotazioni grafiche dei valori di controllo generati con ciascun dosaggio, tra cui medie mobili, DS e % CV. Queste informazioni faciliteranno l'analisi delle tendenze dei controlli per quanto riguarda le prestazioni dei lotti di controllo attuali e pregressi rispetto ai dati forniti nel controllo di qualità. Le tendenze aiuteranno a identificare i dosaggi che generano valori di controllo significativamente diversi dal rispettivo intervallo medio.

Quando si interpretano i dati dei controlli, occorre tenere conto del fatto che il prodotto è stato progettato e sviluppato come prodotto per l'utilizzo manuale. L'intervallo riportato sul certificato del controllo di qualità deve essere appropriato per i dosaggi eseguiti manualmente e rispettando rigorosamente la procedura di dosaggio descritta sopra. Gli esperti del controllo di qualità riconoscono che, a causa delle differenze di condizioni e di prassi, si avrà sempre una variabilità nei valori medi e nella precisione delle misurazioni dei controlli eseguite da laboratori diversi⁸.

11. CALCOLO DEI RISULTATI

Sono disponibili vari pacchetti software di elaborazione dei dati, che possono essere utilizzati per generare la curva di calibrazione media e per calcolare le concentrazioni medie di campioni e controlli sconosciuti. È necessario un adattamento della curva logistica a 4 parametri (4PL) **che includa il calibratore 0**. Gli altri algoritmi di adattamento della curva non sono raccomandati.

In alternativa, è possibile preparare una curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica tracciando un grafico con l'assorbanza media sull'asse delle ordinate e la concentrazione dell'analita sull'asse delle ascisse. Nella curva di calibrazione deve essere incluso il calibratore 0. Leggere il valore medio dell'assorbanza di ciascun campione sconosciuto dalla curva.

Affinché i risultati del dosaggio siano considerati validi, i calibratori e i controlli del kit devono rientrare nelle specifiche riportate nel certificato di analisi specifico del lotto.

In caso contrario, i risultati dei test associati non saranno validi e i campioni dovranno essere analizzati nuovamente.

NOTA: Per campioni con concentrazione superiore a 400 mIU/mL diluire il campione con Incubation buffer.

12. VALORI ATTESI

I valori sierici di β -HCG sono compresi nei seguenti intervalli:

	Reference range (mIU/mL)
Donne normali	<8.0
Gravidanza	
1° settimana	3,0 - 100
2° settimana	10 - 1000
3° settimana	100 - 10000
4° settimana	1000 - 100000
2° mese	15000 - 200000
3° mese	10000 - 100000

Gli intervalli sopraindicati devono essere considerati solo come linee guida; si raccomanda a ogni laboratorio di stabilire i propri intervalli di valori attesi sulla base della propria popolazione di pazienti.

13. CARATTERISTICHE DI AZIONE

Sono mostrati i dati più rappresentativi delle prestazioni. I risultati ottenuti nei singoli laboratori possono variare.

13.1. Precisione

13.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (16x) la misura di tre differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è $\leq 7,6\%$.

13.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando la misura di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è $\leq 8,8\%$.

13.2. Accuratezza

La prova di recupero condotta su un campione arricchito con 6,25 - 12,5 - 25 - 50 mIU/mL di β -HCG ha dato un valore medio ($\pm$ SD) di $99,2\% \pm 4,1\%$.

13.3. Specificità

La cross-reattività del kit β -HCG ELISA è stata calcolata sulla base dei rapporti di massa:

β -HCG	100 %
hFSH	3,0 %
HCG	4,0 %
hTSH	0,02%

13.4. Sensibilità

La concentrazione minima di β -HCG misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,09 mIU/mL con un limite di confidenza del 95%.

13.5. Correlazione

Il kit β -HCG ELISA (y) è stato comparato con un kit disponibile in commercio (x). Sono stati testati i campioni di siero di 49 donne.

La curva di regressione è :

n	Pendenza	Intercetta (mIU/mL)	Correlation coefficient (r)
49	0,94	-0,02	0,96 ($R^2 = 0,92$)

13.6. Effetto "Hook"

In questo metodo non è stato osservato effetto Hook fino a 250.000 mIU/mL.

14. LIMITAZIONI D'USO

- Come nel caso di qualsiasi procedura diagnostica, i risultati devono essere interpretati unitamente ai dati clinici del paziente e alle altre informazioni a disposizione del medico.
- Non sono state stabilite le caratteristiche di azione di questo dosaggio nella popolazione pediatrica.
- Gli anticorpi eterofili nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline dei reagenti, interferendo con gli immunodosaggi *in vitro*⁹. I pazienti regolarmente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero animale possono essere soggetti a questa interferenza, quindi si potrebbero osservare valori anomali.

15. GESTIONE DEI RIFIUTI

I reagenti devono essere smaltiti in conformità alle normative locali.

Tutti i materiali che sono entrati in contatto con i campioni e i reagenti devono essere smaltiti in conformità con le normative nazionali, regionali e locali.

16. BIBLIOGRAFIA

1. Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22/8 1243 - 1255 (1976)
2. Shome, B. et al, J. Clin. Endocr. Metab., 39 199–202 (1974)
3. Uotila, M. et al, J. Immunol. Methods, 42, 11-15 (1981)
4. Acosta, A.A.M.D. and Wright, G.L., Journal of Clinical Immunoassays, 6, 41 (1983).
5. Cohen, K. L., Metabolism, 26 1165-1177 (1977)
6. Lindstedt ScandJ Clin Lab Invest 42 201 (1982)
7. Chien J. Clin. Endocr. Metab. 64.313 (1987)
8. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
9. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27–33

17. IDENTIFICATORE DELLE REVISIONI

Le aggiunte o le modifiche alle istruzioni per l'uso sono indicate dall'evidenziazione in grigio.

18. RECLAMI SUI PRODOTTI E SUPPORTO TECNICO

Per un paziente/utente/terza parte nell'Unione Europea e nei Paesi con un regime normativo simile (Regolamento 2017/746/UE relativo ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*); se, durante l'uso di questo dispositivo o come risultato del suo utilizzo, si è verificato un incidente grave, segnalarlo al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità normativa nazionale.

Il produttore può essere contattato tramite il relativo servizio clienti o il team di supporto tecnico. I dettagli di contatto sono disponibili di seguito e sul sito Web dell'azienda: www.diametra.com.

Ed. 03/2024

DCM014-13



DCM014-13

Ed. 03/2024

b-HCG ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of β -HCG in human serum or plasma.

IVD

LOT

See external label

2°C  8°C $\Sigma = 96$ tests

REF DKO014

1. INTENDED PURPOSE

For *In Vitro* Diagnostic Use

For Laboratory Professional Use

b-HCG ELISA is a manual *in vitro* diagnostic device intended for the quantitative determination of β -HCG in human serum or plasma from an adult population.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

Human chorionic gonadotropin (HCG) is a glycoprotein hormone secreted in pregnancy, that is made by the embryo soon after conception and later by syncytiotrophoblasts (part of the placenta). Its role is to prevent the disintegration of the corpus luteum of the ovary and thereby maintain progesterone production that is critical for a pregnancy in humans. HCG may have additional functions, for instance it is thought that it affects the immune tolerance of the pregnancy.

Pregnancy tests measure the levels of HCG in the blood or urine to indicate the presence or absence of an implanted embryo. Pregnancy tests employ an antibody that is specific to the β -subunit of HCG (β -HCG). This is important so that tests do not make false positives by confusing HCG with LH and FSH.

β -HCG is also secreted by some cancers including teratomas and choriocarcinomas. Elevated levels cannot prove the presence of a tumour and low levels do not rule it out.

3. PRINCIPLE OF THE METHOD

b-HCG ELISA is based on the simultaneous capture of HCG by a monoclonal antibody immobilised on the microplate and directed against the β -HCG fraction and another monoclonal antibody conjugated with peroxidase horseradish (HRP) and directed against the fraction β -HCG.

After the incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid phase washing. Then, the enzyme HRP in the bound fraction reacts with the Substrate (H_2O_2) and the TMB Substrate and develops a blue colour that changes into yellow when the Stop Solution (H_2SO_4) is added. The colour

intensity is proportional to the β -HCG concentration in the sample.

β -HCG concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

4. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

4.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

ProClin >0.0015%, BSA 1.4%

CAL0

REF DCE002/1406-0

CAL1

REF DCE002/1407-0

CAL2

REF DCE002/1408-0

CAL3

REF DCE002/1409-0

CAL4

REF DCE002/1410-0

CAL5

REF DCE002/1411-0

2. Control (1 vial, 1 mL)

Concentration of Control is indicated on the Certificate of Analysis. ProClin >0.0015%, BSA 1.4%

REF DCE045/1403-0

3. Incubation buffer (1 vial, 50 mL)

Phosphate buffer 50 mM pH 7.4, BSA 1 g/L. ProClin >0.0015%

REF DCE001/1401-0

4. Conjugate (1 vial, 1 mL)

Monoclonal anti- α -HCG subunit conjugated with horseradish peroxidase (HRP). ProClin >0.0015%, BSA 1.0%

REF DCE002/1402-0

5. Coated Microplate (1 microplate breakable)

Monoclonal anti- β -HCG subunit adsorbed on microplate

REF DCE002/1403-0

6. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0.26 g/L) (avoid any skin contact)

ProClin <0.0015%

REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15M (avoid any skin contact)

REF DCE005-0

8. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L. Contains ProClin >0.0015%

REF DCE006-0

4.2. Materials required but not provided

Distilled water

4.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser
Precision Pipetting Devices
Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)

5. WARNINGS

- This kit is intended for *in vitro* use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
-  Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents (calibrators, control, incubation buffer, conjugate and wash solution) contain small amounts of ProClin™ 300 (>0.0015%, <0.06%) as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Skin sensitivity, Category 1



Warning

Contains: ProClin 300

Hazard statements:

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

P261 - Avoid breathing dust / fume / gas / mist / vapours / spray.

P280 - Wear protective gloves/ protective clothing / eye protection / face protection / hearing protection.

P321 - Specific treatment (see supplemental first aid instruction on this label).

P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362+P364 - Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous, corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to direct sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

6. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2 – 8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22 – 28°C) and mix well prior to use.

- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately validated for its intended use/purpose.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic, icteric or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- Fresh disposable tips must be used when pipetting assay reagents including samples, calibrators and controls to mitigate the risk of carryover contamination. Failure to do so may lead to invalid results.

7. REAGENT STORAGE AND STABILITY

Store the kit at 2 – 8°C in the dark.

- The kit is stable at 2 – 8°C until the expiry date stated on the external kit label.
- Once opened, the calibrators are stable at 2 – 8°C for 6 months*.
- The diluted wash solution is stable for 30 days at 2 – 8°C.

Important note: open the bag containing the Coated Microplate only when it is at room temperature and close it immediately after use.

8. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

The assay should be performed using serum or plasma samples.

Sample Storage	Duration
2 – 8 °C	2 days
Freeze/thaw cycles	1 cycle

9. PROCEDURE

9.1. Preparation of Calibrators and Controls

Before use, mix for 5 minutes with a rotating mixer.

The Calibrators are ready to use, are calibrated against the WHO 1st IRP 75/537 and have the following concentrations:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
mIU/mL	0	1	5	20	100	400

The control is ready to use; the concentration is printed on the label.

9.2. Preparation of the Conjugate

Prepare immediately before use.

Add 10 µL conjugate (reagent 4) to 1.0 mL of Incubation Buffer (reagent 3). The quantity of diluted Conjugate is proportional at the number of tests.

Mix gently for 10 minutes with a rotating mixer. Stable for 3 hours at room temperature (22 – 28°C).

9.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the content of the vial "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio.

It is possible to observe the presence of crystals within the concentrated wash solution; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals. For greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 1000 mL, taking care also to transfer crystals completely by rinsing of the bottle, then mix until crystals are completely dissolved.

9.4. Preparation of Samples

The determination of β-HCG can be performed in human serum or plasma samples.

Fasting samples are not necessary and no special sample preparations are required.

Collect blood by venepuncture into vacutainers and separate serum (after clot formation) or plasma from the cells by centrifugation.

Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. Before using, mix gently, for 5 minutes, with a roller mixer.

9.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22 – 28 °C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, immediately store the reagents at 2 – 8°C: avoiding long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2 – 8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve

(C₀-C₅), two for the Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	25 µL		
Sample/Control		25 µL	
Diluted conjugate	100 µL	100 µL	

Incubate 1 h at room temperature (22 – 28°C).

Remove the contents from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution.

Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.

Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.

TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Incubate at 22 – 28°C for 15 minutes in the dark.

Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Shake gently the microplate.

Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.

10. QUALITY CONTROL

Good Laboratory Practice (GLP) requires the use of quality control specimens in each series of assays in order to check the performance of the assay. Controls should be treated as unknown samples, and the results analysed with appropriate statistical methods.

The kit controls provided in the kit should be tested as unknown and is intended to assist in assessing the validity of results obtained with each assay plate.

The mean concentration of the control level is documented in the QC report included with each kit. These mean concentration levels are determined over several assays which are run in duplicate in multiple locations across each plate.

DiaMetra recommends the users to maintain graphic records of the control values generated with each assay run, including the running means, SDs and %CVs. This information will facilitate the controls trending analysis relating to the performance of current and historical control lots relative to the supplied Quality Control data. The trending will assist in the identification of assays which give control values significantly different from their average range.

When interpreting control data, users should note that this product was designed and developed as a manual product. The range stated on the QC certificate should be appropriate for assays that are performed manually and with strict adherence to the Assay Procedure described above. It is recognised by Quality Control professionals, that as a result of differences in conditions and practices, there will always be variability in the mean values and precision of control measurements between different laboratories⁸.

11. CALCULATION OF RESULTS

A variety of data reduction software packages are available, which may be employed to generate the mean calibration curve and to calculate the mean concentrations of unknown samples and controls. A 4-parameter logistic (4PL) curve fit or Sigmoidal, **including Calibrator 0 is required**. Other curve fitting algorithms are not recommended.

Alternatively, a calibration curve may be prepared on semi-log graph paper by plotting mean absorbance on the Y-axis against concentration of analyte on the X-axis. Calibrator 0 should be included in the calibration curve. Read the mean absorbance value of each unknown sample off the curve.

In order for the assay results to be considered valid the kit calibrators and control must fall within the specifications detailed in the lot specific certificate of analysis.

If a control is out of its specified range, the associated test results are invalid and samples must be retested.

NOTE: If the absorbance of a sample exceeds 400 mIU/mL, the sample should be diluted in **incubation buffer** and re-analysed.

12. EXPECTED VALUES

The serum β -HCG reference values are:

	Reference range (mIU/mL)
Non- pregnant	<8.0
Pregnancy	
1° week	3.0 - 100
2° week	10 - 1000
3° week	100 - 10000
4° week	1000 - 100000
2° month	15000 - 200000
3° month	10000 - 100000

The above ranges should be considered as guidelines only; it is recommended that each laboratory establish its own expected range based upon its own patient population.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Representative performance data are shown. Results obtained at individual laboratories may vary.

13.1. Precision

13.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate (16x) the measurement of three different control sera in one assay. The within assay variability is $\leq 7.6\%$.

13.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate the measurement of three different control sera in different lots. The between assay variability is $\leq 8.8\%$.

13.2. Accuracy

The recovery of 6.25 - 12.5 - 25 - 50 mIU/mL of β -HCG added to sample gave an average value ($\pm$ SD) of $99.2\% \pm 4.1\%$ with reference to the original concentrations.

13.3. Specificity

Cross reactivity values of the β -HCG ELISA has been calculated on a weight/weight basis:

β -HCG	100 %
hFSH	3.0 %
HCG	4.0 %
hTSH	0.02%

13.4. Sensitivity

The lowest detectable concentration of β -HCG that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.09 mIU/mL at the 95% confidence limit.

13.5. Method comparison

β -HCG ELISA (y) was compared to another commercially available β -HCG assay (x). Serum samples of 49 females were analysed according to both test systems.

The linear regression curve was calculated:

n	Slope	Intercept (mIU/mL)	Correlation coefficient (r)
49	0.94	-0.02	0.96 ($R^2 = 0.92$)

13.6. Hook Effect

β -HCG ELISA, a competitive enzyme immunoassay, shows no Hook Effect up to 250.000 mIU/mL.

14. LIMITATIONS OF USE

- As in the case of any diagnostic procedure, results must be interpreted in conjunction with the patient's clinical presentation and other information available to the physician.
- The performance characteristics of this assay have not been established in a paediatric population.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with *in vitro* immunoassays⁹. Patients routinely exposed to animals or to animal serum products can be

prone to this interference and anomalous values may be observed.

15. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed of in accordance with local regulations.

All materials that have come into contact with samples and reagents must be disposed of in accordance with country, state and local regulations.

16. BIBLIOGRAPHY

1. Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22/8 1243 - 1255 (1976)
2. Shome, B. et al, J. Clin. Endocr. Metab.,39 199–202 (1974)
3. Uotila, M. et al, J. Immunol. Methds, 42,11-15 (1981)
4. Acosta, A.A.M.D. and Wright, G.L., Journal of Clinical Immunoassays, 6, 41 (1983).
5. Cohen, K. L., Metabolism, 26 1165-1177 (1977)
6. Lindstedt ScandJ Clin Lab Invest 42 201 (1982)
7. Chien J. Clin. Endocr. Metab. 64.313 (1987)
8. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
9. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27–33

17. REVISION IDENTIFIER

Additions or changes to the IFU are indicated by grey highlighting.

18. PRODUCT COMPLAINTS AND TECHNICAL SUPPORT

For a patient/user/third party in the European Union and in countries with similar regulatory regime (Regulation 2017/746/EU on IVD Medical Devices); if, during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorised representative and to your national regulatory authority.

The manufacturer can be contacted through their customer service or technical support team. The contact details can be found below and on the company website: www.diametra.com.

Ed. 03/2024

DCM014-13



DCM014-13

Ed. 03/2024

b-HCG ELISA

para el análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de β -HCG en suero o plasma humano

IVD

LOT

Ver etiqueta
externa

2°C 8°C

 $\Sigma = 96$ pruebas

REF DKO014

1. FINALIDAD PREVISTA

Para uso en diagnóstico *in vitro*

Para uso profesional de laboratorio

El HCG ELISA es un dispositivo manual de diagnóstico *in vitro* destinado a la determinación cuantitativa de la gonadotropina coriónica humana (hCG) en suero o plasma humano en una población adulta.

2. IMPORTANCIA CLÍNICA

La hCG es una hormona glicoproteica secretada durante el embarazo, sintetizada por el embrión justo después de la concepción y posteriormente por la placenta. Su función consiste en evitar la desintegración del cuerpo lúteo del ovario y promover así la síntesis de la progesterona, que es una condición esencial para el embarazo en los seres humanos. La hCG tiene otras funciones, como por ejemplo, está involucrada en la inmunotolerancia del embarazo.

La comprobación, durante el embarazo, de los niveles de hCG en sangre o en la orina indica la presencia o ausencia de un embrión implantado. En particular, las pruebas de embarazo emplean un anticuerpo que es específico de la unidad β de hCG (β -hCG). Esto es importante para que las pruebas no generen falsos positivos con LH y FSH.

La β -hCG es secretada por algunas células cancerosas como, por ejemplo, el teratoma y el coriocarcinoma. Pero los niveles altos no pueden demostrar la presencia de un tumor y los niveles bajos no lo excluyen.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El HCG ELISA se basa en la unión simultánea de la HCG a dos anticuerpos monoclonales, uno inmovilizado en la placa de micropocillos que es específico para la subunidad β y el otro conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP), específico para la subunidad α .

Tras la incubación, la separación ligada/libre se realiza mediante un simple lavado en fase sólida. A continuación, la enzima HRP de la fracción ligada reacciona con el sustrato (H_2O_2) y el sustrato de TMB, y desarrolla un color azul que cambia a amarillo cuando se añade la solución de detención (H_2SO_4). La intensidad del color es proporcional a la concentración de HCG de la muestra.

La concentración de HCG de la muestra se calcula mediante una curva de calibración.

4. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

4.1. Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (6 viales de 1 mL cada uno)

ProClin >0,0015% y BSA 1,4%

CAL0

REF DCE002/1406-0

CAL1

REF DCE002/1407-0

CAL2

REF DCE002/1408-0

CAL3

REF DCE002/1409-0

CAL4

REF DCE002/1410-0

CAL5

REF DCE002/1411-0

2. Control (1 vial de 1 mL)

La concentración de los controles se indica en el certificado de análisis. ProClin >0,0015%, BSA 1,4%

REF DCE045/1403-0

3. Tampón de incubación (1 vial, 50 mL)

Tampón fosfato 50 mM pH 7,4; BSA 1 g/L.

Proclin >0,0015%

REF DCE001/1401-0

4. Conjugado (1 vial, 1 mL)Anticuerpo monoclonal dirigido contra la subunidad α - HCG conjugado con peroxidasa de rábano (HRP).

Proclin >0,0015% y BSA

REF DCE002/1402-0

5. Microplaca recubierta (1 microplaca que se puede romper)Anticuerpo monoclonal dirigido contra la subunidad β - HCG absorbido en la microplaca

REF DCE002/1403-0

6. Sustrato de TMB (1 vial, 15 mL) H_2O_2 -TMB 0,26 g/L (evitar el contacto con la piel). ProClin <0,0015%

REF DCE004-0

7. Solución de parada (1 vial, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 M (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

8. Conc. 50X Solución de lavado (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L. ProClin >0,0015%

REF DCE006-0

4.2. Materiales necesarios pero no suministrados

Agua destilada

4.3. Materiales auxiliares e instrumentación

Dispensador automático

Dispositivos de pipetas de precisión

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

5. ADVERTENCIAS

- Este kit está destinado al uso *in vitro* realizado exclusivamente por profesionales. No es para uso interno o externo en personas ni animales.
- Utilice el equipo de protección personal adecuado cuando trabaje con los reactivos suministrados.
- Siga las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) para manipular productos sanguíneos.

-  El material de origen animal utilizado en la preparación del kit se ha obtenido de animales certificados como sanos y la proteína bovina se ha obtenido de países donde no hay infección de EEB, pero estos materiales deben manejarse como potencialmente infecciosos.

- Algunos reactivos (calibradores, control, tampón de incubación, conjugado y solución de lavado) contienen pequeñas cantidades de ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.

- Clasificación según Reglamento (UE) n° 1272/2008 [CLP]

Sensibilización cutánea, categoría 1



Atención

Contiene: ProClin 300

Indicaciones de peligro:

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia:

P261 - Evitar respirar el polvo / el humo / el gas / la niebla / los vapores / el aerosol.

P280 - Llevar guantes / ropa de protección / equipo de protección para los ojos / la cara / los oídos.

P321 - Se necesita un tratamiento específico (ver instrucciones de primeros auxilios en esta etiqueta).

P333+P313 - En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P362+P364 - Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

- La solución de detención consiste en una solución diluida de ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico es venenoso, corrosivo y puede ser tóxico si se ingiere. Para evitar quemaduras químicas, evite el contacto con la piel y los ojos.
- Evite la exposición del reactivo TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, a metales o a oxidantes. No congele la solución.

6. PRECAUCIONES

- Siga estrictamente la secuencia de pasos de pipeteado que se indica en este protocolo. Los datos de rendimiento representados en este documento se obtuvieron utilizando los reactivos específicos indicados en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse refrigerados entre 2 y 8 °C en su envase original. Las excepciones se indican claramente.
- Deje que todos los componentes del kit y las muestras alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) y mezcle bien antes de usarlos.
- No intercambie componentes del kit procedentes de diferentes lotes. Debe respetarse la fecha de caducidad impresa en las etiquetas de la caja y de los viales. No utilice ningún componente del kit después de su fecha de caducidad.
- Si el usuario utiliza un equipo automatizado, tiene la responsabilidad de asegurarse de que el kit ha sido debidamente validado para su uso previsto.
- La eliminación incompleta o imprecisa del líquido de los pocillos podría alterar la precisión del ensayo y/o aumentar el fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en sistemas automáticos se recomienda aumentar el número de lavados.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debe prolongarse más de diez minutos para evitar errores en el ensayo. Si se necesitan más de 10 minutos, siga el mismo orden de dispensación. Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta en cada placa.
- La adición de la solución de sustrato de TMB inicia una reacción cinética, que finaliza al añadir la solución de detención. Por lo tanto, el sustrato de TMB y la solución de detención deben añadirse en la misma secuencia para eliminar las posibles desviaciones temporales durante la reacción.
- Respete las directrices para realizar el control de calidad en los laboratorios médicos mediante el ensayo de controles y/o sueros combinados.
- Se requiere la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No se deben usar en el ensayo muestras contaminadas microbiológicamente, muy lipémicas, ictericas o hemolizadas.
- Los lectores de placas miden en vertical. No toque el fondo de los pocillos.
- Deben emplearse puntas desechables nuevas al pipetear reactivos de ensayo, incluidas las muestras, los calibradores y los controles, para mitigar el riesgo de contaminación por arrastre. De lo contrario, los resultados podrían no ser válidos.

7. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Almacene el kit a 2-8 °C en un lugar oscuro.

- El kit es estable a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta externa.
- Una vez abierto, los calibradores son estable a 2-8 °C durante 6 meses.
- La solución de lavado diluida es estable durante 30 días a 2-8 °C.

Nota importante: abra la bolsa que contiene la microplaca recubierta solo cuando esté a temperatura ambiente y ciérrela inmediatamente después de su uso.

8. RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El ensayo debe realizarse usando muestras de suero o plasma.

Almacenamiento de muestras	Duración
2-8 °C	2 días
Ciclos de congelación/descongelación	1 ciclo

9. PROCEDIMIENTO

9.1. Preparación de calibradores y controles

Antes de utilizar, mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

Los Calibradores son listo para usar, son calibrados frente a WHO 1^a IRP 75/537, y tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
mIU/mL	0	1	5	20	100	400

Los controles están listos para su uso; la concentración del control está impresa en la etiqueta.

9.2. Preparación del conjugado

Preparar inmediatamente antes del uso.

Añadir 10 µL de conjugado (reactivo 4) a 1 mL de tampón de incubación (reactivo 3). La cantidad de conjugado que se debe preparar es proporcional al número de ensayos.

Mezclar con cuidado dejando al menos 10 minutos en el agitador giratorio. Estable durante al menos 3 horas a temperatura ambiente (22-28 °C).

9.3. Preparación de la solución de lavado

Diluir el contenido del vial «50X Conc. Wash Solution» con agua destilada hasta un volumen final de 1000 mL antes de usarlo. Para volúmenes más pequeños, respete la relación de dilución de 1:50.

Es posible que observe la presencia de cristales dentro de la solución de lavado concentrada; en este caso, mezcle a temperatura ambiente hasta la completa disolución de los cristales. Para una mayor precisión, diluya todo el frasco de solución de lavado concentrada a 1000 mL, teniendo cuidado también de transferir los cristales enjuagando

completamente el frasco y luego mezclando hasta que los cristales se disuelvan completamente.

9.4. Preparación de las muestras

La determinación de la β-hCG se realiza en suero o plasma humano.

No es necesario tomar muestras en ayunas y no se requiere ninguna preparación especial de las muestras.

Recoja la sangre mediante venopunción en vacutainers y separe el suero (después de la formación del coágulo) o el plasma de las células mediante centrifugación.

Almacenar la muestra a -20 °C si la determinación no se lleva a cabo el mismo día que se recoge la muestra. Antes de utilizar, mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

9.5. Procedimiento

- **Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) durante al menos 30 minutos.** Al finalizar el ensayo, almacene inmediatamente los reactivos a 2-8 °C: evite la exposición prolongada a la temperatura ambiente.
- Las tiras de micropocillos recubiertas no utilizadas deben dejarse de forma segura en el envoltorio de papel de aluminio que contiene desecante y almacenarse a 2-8 °C.
- Para evitar que se produzca una posible contaminación microbiana y/o química, los reactivos no utilizados nunca se deberán transferir a los viales originales.
- Como es necesario realizar la determinación por duplicado para mejorar la precisión de los resultados de la prueba, prepare dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para el control, dos para cada muestra y uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/Controles	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₅	25 µL		
Muestra / Controles		25 µL	
Conjugado diluido	100 µL	100 µL	
Incube durante 1 hora a temperatura ambiente (22-28 °C). Retire el contenido de cada pocillo, lave los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.			
Nota importante: en cada paso de lavado, agite ligeramente la placa durante 5 segundos y elimine el exceso de solución golpeando la placa invertida sobre un paño de papel absorbente.			
Lavadora automática: si utiliza un equipo automático, lave los pocillos al menos 5 veces.			
Sustrato de TMB	100 µL	100 µL	100 µL

Incube durante 15 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente (22-28 °C).

Solución de detención	100 µL	100 µL	100 µL
-----------------------	--------	--------	--------

Agite suavemente la microplaca.
Compare la absorbancia (E) a 450 nm con la obtenida con una longitud de onda de referencia de 620-630 nm o con el blanco en un plazo de 5 minutos.

10. CONTROL DE CALIDAD

Las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) requieren el uso de muestras de control de calidad en cada serie de ensayos para comprobar el rendimiento del ensayo. Los controles deberán tratarse como muestras desconocidas y los resultados deberán analizarse con métodos estadísticos adecuados.

Los controles incluidos en el kit deberán ser probados como desconocidos y están destinados a ayudar a evaluar la validez de los resultados obtenidos con cada placa de ensayo.

La concentración media de cada nivel de control se documenta en el informe de control de calidad que se incluye en cada kit. Los niveles de concentración media se determinan respecto de varios análisis, los cuales se realizan por duplicado en varios puntos diferentes de cada placa.

DiaMetra recomienda que los usuarios mantengan registros gráficos de los valores de control que se generan con cada ensayo, incluida la media de ejecución, la DE (desviación estándar) y el % CV. Esta información facilitará los ensayos de tendencia de los controles relacionados con el rendimiento de lotes de control actuales e históricos relativos a los datos de control de calidad proporcionados. La tendencia facilitará la identificación de los análisis que generan valores de control significativamente distintos de su intervalo medio.

Al interpretar los datos de control, los usuarios deberán tener en cuenta que este producto fue diseñado y desarrollado como un producto manual. El rango establecido en el certificado de control de calidad deberá ser adecuado para los ensayos que se realizan manualmente y en estricto cumplimiento del procedimiento de ensayo anteriormente descrito. Los profesionales del control de calidad reconocen que, como resultado de las diferencias en las condiciones y en las prácticas, siempre habrá variaciones entre laboratorios en los valores medios y en la precisión de las mediciones de control¹⁸.

11. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Hay disponibles diversos paquetes de software de reducción de datos que se pueden utilizar para generar el promedio de la curva de calibración y para calcular el promedio de las concentraciones de muestras y controles desconocidos. Es necesario un ajuste de curva logístico de 4 parámetros (4PL), **incluido el calibrador 0**. No se recomiendan otros algoritmos de ajuste de curva.

También se puede preparar una curva de calibración en papel semilogarítmico mediante el trazado de la

absorbancia media en el eje Y frente a la concentración de analitos en el eje X. El calibrador 0 debe incluirse en la curva de calibración. Lea el valor de absorbancia medio de cada muestra desconocida que se encuentra fuera de la curva.

Para que los resultados del ensayo se consideren válidos, los calibradores y el control del kit deben ajustarse a las especificaciones detalladas en el certificado de análisis específico del lote.

Si un control está fuera de su rango especificado, los resultados de la prueba asociados no son válidos y se deben volver a realizar pruebas de las muestras.

NOTA: Para muestras con una concentración superior a 400 mIU/mL, diluir la muestra con tampón de incubación.

12. VALORES ESPERADOS

Los valores séricos de β HCG se incluyen en los siguientes intervalos:

	LH (mIU/mL)
Mujeres normales	<8.0
Embarazo	
1° settimana	3.0 - 100
2° settimana	10 - 1000
3° settimana	100 - 10000
4° settimana	1000 - 100000
2° mese	15000 - 200000
3° mese	10000 - 100000

Los rangos anteriores deberán ser considerados como directrices solamente; se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango previsto en función de su propia población de pacientes.

13. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se muestran los datos de rendimiento representativos. Los resultados obtenidos en diferentes laboratorios pueden diferir.

13.1. Precisión

13.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (16x) la determinación de tres sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es $\leq 7,6\%$.

13.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando la determinación de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es $\leq 8,8\%$.

13.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en una muestra enriquecida con 6,25 - 12,5 - 25 - 50 mIU/mL de β -hCG ha dado un valor medio ($\pm$ SD) de 99,2% $\pm$ 4,1%.

13.3. Especificidad

La reactividad cruzada del kit β -hCG ELISA se calculó basándose en las relaciones de masa:

β -HCG	100 %
hFSH	3,0 %
HCG	4.0 %
hTSH	0.02%

13.4. Sensibilidad

La concentración mínima de β -hCG medible que puede distinguirse del Calibrador 0 es de 0,09 mIU/mL con un límite de confianza del 95%.

13.5. Correlación

El kit β -hCG se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado muestras de suero de 49 mujeres.

La curva de regresión es:

n	Pendiente	Intersección (mIU/mL)	Coefficiente de correlación (r)
49	0,94	-0,02	0,96 ($R^2 = 0,92$)

13.6. Efecto gancho

En este método no se ha observado efecto gancho hasta 250.000 mIU/mL.

14. LÍMITES DE USO

- Como en cualquier procedimiento diagnóstico, los resultados se deberán interpretar junto con los hallazgos clínicos del paciente y otra información de la que el médico disponga.
- Las características de rendimiento de este análisis no se han establecido para una población pediátrica.
- Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden presentar reacciones con las inmunoglobulinas reactivas, que interfieren con los inmunoensayos *in vitro*⁹. Los pacientes que se exponen habitualmente a animales o a productos de suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y puede que se observen valores anómalos.

15. GESTIÓN DE RESIDUOS

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa local.

Todos los materiales que hayan entrado en contacto con las muestras y los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa nacional, estatal y local.

16. BIBLIOGRAFÍA

1. Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22/8 1243 - 1255 (1976)
2. Shome, B. et al, J. Clin. Endocr. Metab.,39 199-202 (1974)
3. Uotila, M. et al, J. Immunol. Methds, 42,11-15 (1981)
4. Acosta, A.A.M.D. and Wright, G.L., Journal of Clinical Immunoassays, 6, 41 (1983).
5. Cohen, K. L., Metabolism, 26 1165-1177 (1977)
6. Lindstedt ScandJ Clin Lab Invest 42 201 (1982)
7. Chien J. Clin. Endocr. Metab. 64.313 (1987)
8. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
9. Boscatto, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. Clin Chem, 34, 1988, pp 27-33

17. IDENTIFICADOR DE REVISIÓN

Las adiciones o cambios en las instrucciones de uso se han resaltado en gris.

18. RECLAMACIONES SOBRE PRODUCTOS Y ASISTENCIA TÉCNICA

Para un paciente/usuario/tercero en la Unión Europea y en países con un régimen regulatorio similar: Reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*; si, durante el uso de este dispositivo o como resultado de su uso, se ha producido un incidente grave, informe del mismo al fabricante y/o a su representante autorizado y al organismo regulador nacional.

Puede contactar con el fabricante a través del servicio de atención al cliente o del equipo de asistencia técnica. Los datos de contacto se encuentran a continuación y en el sitio web de la empresa: www.diametra.com.

Ed. 03/2024

DCM014-13

	DE ES FR EN IT PT	<i>In vitro</i> Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico <i>In vitro</i> Dispositif medical de diagnostic <i>in vitro</i> <i>In vitro</i> Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Dispositivos medicos de diagnostico <i>in vitro</i>		DE ES FR EN IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR EN IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR EN IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR EN IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR EN IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR EN IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso		DE ES FR EN IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR EN IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes		DE ES FR EN IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR EN IT PT	Temperaturbereich Limitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação		DE ES FR EN IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR EN IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			