



DiaMetra



## b-HCG

para análisis de rutina

Determinazione immunoenzimatica diretta della b-HCG nel siero o plasma umano.

IVD



LOT

ver etiqueta externa

2°C 8°C



Σ = 96 ensayos

REF DKO014

### USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de b-HCG en suero o plasma humano.

El kit b-HCG está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

### 1. SIGNIFICADO CLÍNICO

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.

### 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El β-hCG ELISA TEST se basa en la captura simultánea de la β-hCG humana por parte de dos anticuerpos monoclonales, uno inmovilizado en la microplaca y el otro conjugado con peroxidasa (HRP).

Tras un determinado período de incubación, la separación libre-unido se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

La enzima presente en la fracción unida cataliza la reacción entre el sustrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el sustrato TMB (TMB), desarrollando una coloración azul que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de β-hCG presente en la muestra.

La concentración de la β-hCG en la muestra se calcula tomando como base una serie de estándares.

### 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

#### 3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Estándares (STD) de β-hCG (6 frascos, 1 mL cada uno)

STD0 REF DCE002/1406-0

STD1 REF DCE002/1407-0

STD2 REF DCE002/1408-0

STD3 REF DCE002/1409-0

STD4 REF DCE002/1410-0

STD5 REF DCE002/1411-0

2. β-HCG Control (1 frasco, 1 mL)

La concentración del Control se indica en el certificado de calidad (Quality Control Report)

REF DCE045/1403-0

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

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

REF DCE001/1401-0

4. Conjugado (1 frasco, 1 mL)

Anticuerpo anti β-hCG conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)

REF DCE002/1402-0

5. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Anticuerpo anti β-hCG absorbido en la microplaca

REF DCE002/1403-0

6. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004-0

7. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

8. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

#### 3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

#### 3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm)

## Nota

Conservar todos los reactivos a  $2\pm 8$  °C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 5 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar.

No retirar las hojas adhesivas de las tiras que no se vayan a usar en la sesión de análisis.

## 4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de  $\beta$ HCG de 1 mIU/mL a 200.000 mIU/mL.

## 5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8 °C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. si utiliza más de una

placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.

- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de parada. Tanto el sustrato como la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

## 6. PROCEDIMIENTO

### 6.1. Preparación de los estándares (S<sub>0</sub>...S<sub>5</sub>)

Los estándares, calibrados frente a WHO 1<sup>a</sup> IRP 75/551, tienen aproximadamente las siguientes concentraciones:

	S0	S1	S2	S3	S4	S5
mIU/mL	0	1	5	20	100	400

Una vez abiertos, los estándares permanecen estables al menos 6 meses a 2-8°C.

### 6.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de solución de lavado tamponada concentrada (50x) con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8 °C durante al menos 30 días.

### 6.3. Preparación del conjugado diluido

Preparar inmediatamente antes del uso.

Añadir 10  $\mu$ l 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).

### 6.4. Preparación de la muestra

La determinación de la  $\beta$ -hCG se realiza en suero o plasma humano. Si la dosificación no se realiza en un plazo de dos días desde la extracción, conservar la muestra a -20 °C. No volver a congelar las muestras una vez descongeladas.

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

### 6.5. Procedimiento

Puesto que es necesario operar por duplicado, preparar dos pocillos para cada punto de la curva estándar (S<sub>0</sub>-S<sub>5</sub>), dos para cada muestra, dos para Control y uno para el blanco.

Reactivo	Estándar	Muestra /Control	Blanco
Estándares S <sub>0</sub> -S <sub>5</sub>	25 µL		
Muestra /Control		25 µL	
Conjugado diluido	100 µL	100 µL	
Incubar 1 h a temperatura ambiente (22±28°C). Retirar la mezcla de reacción, lavar 3 veces añadiendo a cada pocillo 0,3 mL de solución de lavado diluida.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22±28 °C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente al blanco.			

## 7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar sueros control para los rangos bajo, medio y alto de  $\beta$ -hCG para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

### 7.1. Interpretación de los resultados

Si para calcular los resultados se ha usado el ordenador, es imprescindible que los valores de los calibradores se encuentren dentro del 10 % de las concentraciones asignadas.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (Em) de cada punto de la curva estándar (S<sub>0</sub>-S<sub>5</sub>) y de cada muestra.

### 8.2. Curva estándar

Trazar el gráfico de la absorbancia en función de las concentraciones de los estándares (S<sub>0</sub>-S<sub>5</sub>) (p. ej.: logística de cuatro parámetros o sigmoideo).

### 8.3. Cálculo de los resultados

Interpolarse del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en mIU/mL.

## 9. VALORES DE REFERENCIA

Cada laboratorio debe establecer su propio rango basándose en la población de los pacientes.

Los valores séricos de  $\beta$ HCG se incluyen en los siguientes intervalos:

Mujeres normales: < 8,0 mIU/mL

Embarazo: 1ª semana 3,0 – 100 mIU/mL  
 2ª semana 10 – 1.000 mIU/mL  
 3ª semana 100- 10.000 mIU/mL  
 4ª semana 1 000 – 100 000 mIU/mL  
 2º mes 15.000- 200.000 mIU/mL  
 3º mes 10.000 – 100 000 mIU/mL

## 10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

### 10.1. Precisión

#### 10.1.1. Intraensayo

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

#### 10.1.2. 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  $\leq 8,8\%$ .

### 10.2. Exactitud

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

### 10.3. Especificidad

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

$\beta$ -hCG	100,0%
hFSH	3,0%
hCG	4,0%
hTSH	0,02%

### 10.4. Sensibilidad

La concentración mínima de  $\beta$ -hCG medible que puede distinguirse del estándar cero es de 0,09 mIU/mL con un límite de confianza del 95%.

### 10.5. Correlación con la dosis RIA

El kit  $\beta$ -hCG (Diametra) se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado muestras de suero de 49 mujeres.

La curva de regresión es:

$$y = 0,94 x - 0,02$$

$$r = 0,96 (r^2 = 0,92)$$

### 10.6. Efecto gancho

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

## 11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

---

### 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)

**Ed. 06/2011**

**DCM014-9**

**DiaMetra S.r.l. Headquarter:** Via Garibaldi, 18 –  
20090 SEGRATE (MI) Italy  
Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595 – Fax 0039–  
02–2133354.

**Manufactory:** Via Giustozzi, 35/35a – Z.I Paciana –  
06034 FOLIGNO (PG) Italy  
Tel. 0039-0742–24851 Fax 0039–0742–316197  
E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)

	<b>DIA.METRA SRL</b>	
Mod. PIS	<b>PACKAGING INFORMATION SHEET</b>	

**IT***Spiegazione dei simboli***GB***Explanation of symbols***FR***Explication des symboles***ES***Significado de los símbolos***DE***Verwendete Symbole***PT***Explicação dos símbolos*

	DE In vitro Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico in vitro FR Dispositif medical de diagnostic in vitro GB In vitro Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro PT Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE Hergestellt von ES Fabricante FR Fabriqué par GB Manufacturer IT Produttore PT Produzido por
<b>REF</b>	DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue GB Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo	 yyyy-mm	DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricación FR Date de fabrication GB Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE Verwendbar bis ES Estable hasta (usar antes del último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) GB Use by (last day of the month) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE Biogefährdung ES Riesgo biológico FR Risque biologique GB Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico
	DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones de uso FR Consulter le mode d'emploi GB Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso		DE Chargenbezeichnung ES Código del lote FR Numero de lot GB Batch code IT Codice del lotto PT Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE Ausreichend für "h" Tests ES Contenido suficiente para "h" ensayos FR Contenu suffisant pour "h" tests GB Contains sufficient for "h" tests IT Contenuto sufficiente per "h" saggi PT Contém o suficiente para "h" testes		DE Inhalt ES Contenido del kit FR Contenu du coffret GB Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
 Max Min	DE Temperaturbereich ES Límites de temperatura FR Limites de température de conservation GB Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação		

	<b>DIA.METRA SRL</b>	
Mod. PIS	<b>PACKAGING INFORMATION SHEET</b>	

## **SUGERENCIAS PARA LA SOLUCIÓN DE PROBLEMAS/TROUBLESHOOTING**

### **ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS**

#### **No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

#### **Reacción escasa (DO demasiado bajas)**

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

#### **Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)**

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

#### **Valores inexplicablemente fuera de escala**

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

#### **CV% intraensayo elevado**

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

#### **CV% interensayo elevado**

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

### **ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**

#### **No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

#### **Too low reaction (too low ODs)**

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

#### **Too high reaction (too high ODs)**

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

#### **Unexplainable outliers**

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation