

Gonadotropin hCG kit

ELISA Testkit zur quantitativen Bestimmung
der Choriongonadotropin-Konzentration
in humanem Blutserum
(*Gebrauchsanweisung: Seite 4*)

Enzyme immunoassay for quantitative determination
of human chorionic gonadotropin
in human serum
(*Instructions for use: page 32*)

Manueller Test / Manual test
Automatisierter Test / Automated test

Abschnitt / Section 13
Abschnitt / Section 14

IVD

Gonadotropin hCG Kit
(Manueller Test)
Gonadotropin hCG kit
(manual test)



96 Untersuchungen
96 tests

22-01

REF

Gonadotropin hCG Kit
(Automatisierter Test für
"Alisei")
Gonadotropin hCG kit
(automated test for
"Alisei")









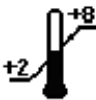



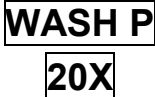













96 Untersuchungen
96 tests

22-01 A

REF

1.KENNZEICHEN / SYMBOLS LEGEND

	In-vitro Diagnostika In vitro diagnostic medical device		EG-Konformitätserklärung EC Declaration of conformity
	Bestellnummer Catalogue number		Chargenbezeichnung Batch code
	Verwendbar bis Use by		Hersteller Manufacturer
	Herstellungsdatum Date of manufacture		Gebrauchsanweisung beachten Consult operating instructions
	Temperaturbegrenzung Temperature limitation		Biogefährdung Biological risks
	Beschichtete Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) Coated microplate (96 wells)		Konjugat Conjugate
	Waschlösung, 20x konzentriert Wash solution, 20X concentrated		Substrat Substrate
	Kalibratoren Calibrators		Stopplösung Stop solution
	Kontrolle Control		Probenverdünnungspuffer Sample Diluent
	Ausreichend für < n > Prüfungen Contains sufficient for <n> tests		Optische Dichte Optical density
	Auflösen mit angegebenem Volumen Reconstitute with specified volume of liquid		Deionisiertes, destilliertes Wasser Deionized or distilled water
	Reizend Irritant		Trial-Lösung, 5000x konzentriert Trial, 5000X concentrated
Warning			

2. VERWENDUNGSZWECK

Der **Gonadotropin hCG Testkit** ist ein Enzymimmunoassay zur **quantitativen Bestimmung** der **Choriongonadotropin-Konzentration (hCG)** in humanem Blutserum.

Der Testkit ist in zwei Variationen erhältlich:

REF 22-01 Für den manuellen Gebrauch

REF 22-01 A Für den Gebrauch mit ELISA-Automat "Alisei", hergestellt durch die Firma Next Level S.r.l.

Anmerkung 1: Der manuelle Test ist für die Pränataldiagnostik während des ersten und zweiten Trimesters sowie für onkologische Tests bestimmt. Der automatisierte Test "Alisei" hingegen ist nur für die Diagnostik im zweiten Trimester bestimmt.

Die Gebrauchsanweisungen befinden sich:

Abschnitt 13 Manueller Test

Abschnitt 14 Automatisierter Test "Alisei"

Anmerkung 2: *Die Konzentrationswerte der Kalibratoren können bei manuellem und automatisiertem Testkit variieren.*

Anmerkung 3: *Wir garantieren verlässliche Testergebnisse bei folgender Anwendung der Testkits*

REF 22-01A *nur für ELISA-Automat "Alisei"*

REF 22-01 *nur für den manuellen Gebrauch.*

Bei Verwendung einer nicht vordefinierten Methode ist der Anwender dafür verantwortlich, sicherzustellen, dass diese für ELISA-Kits angemessen getestet wurde.

HCG ist ein Glykoprotein, das aus zwei Untereinheiten (α und β) besteht. Die quantitative Bestimmung der hCG-Konzentration gilt als der verlässlichste Indikator zur Frühdiagnose einer Schwangerschaft.

Die Änderung der hCG-Konzentration im Blutserum von Schwangeren ist ein wichtiges pränatales Diagnostikverfahren für einige angeborene Erkrankungen.

Außerdem wird diese Diagnostikmethode sehr oft in der Geburtshilfe zur Diagnose von Mehrlingsschwangerschaft, Eileiterschwangerschaft oder bei Gefahr von Fehlgeburten angewendet.

Obwohl die Anwesenheit von hCG im Blutserum gewöhnlich mit einer normal verlaufenden Schwangerschaft verbunden ist, können erhöhte hCG-Konzentrationen auch bei Patienten mit teratogenen Karzinomen oder Trophoblast-Neoplasien auftreten. Seltener werden erhöhte hCG-Konzentrationen auch auf Grund einer ektopischen Synthese bei Hoden-, Brust-, Dünndarm-, Lungen- und Prostatakrebs festgestellt. Die hCG-Konzentration kann bei einigen Tumorarten den Wert von 100000 IU/l überschreiten. Daher ist Bestimmung der hCG-Konzentration ein wichtiges Diagnose- und Monitoringverfahren bei diesen Erkrankungen.

3. TESTPRINZIP

Der **Gonadotropin hCG Testkit** ist ein "Sandwich"-Typ des Festphasen-Enzymimmunoassay, basierend auf zwei monoklonalen Antikörpern, die spezifisch an unterschiedliche Epitope der β -Untereinheit des hCG-Moleküls binden.

Einer dieser Antikörper ist mit der Meerrettich Peroxidase (HRP) konjugiert, der zweite ist an die Innenfläche der Kavität gebunden. Die hCG-Moleküle der Blutserumprobe binden sowohl den immobilisierten Antikörper als auch das Anti-hCG-Peroxidase-Konjugat (Abb. 1).

Beim Waschen der Kavitäten mit der Waschlösung werden alle ungebundenen Komponenten entfernt.

Die Menge des gebundenen Konjugates ist direkt proportional zur hCG-Konzentration in der Probe.

Während der Inkubation mit der TMB-Lösung entwickelt sich die Farbreaktion. Die Farbintensität ist direkt proportional zur hCG-Konzentration der Probe. Die hCG-Konzentration in der Patientenprobe wird mit einer Standardkurve, die mit dem Testkit erarbeitet wird, ausgelesen.

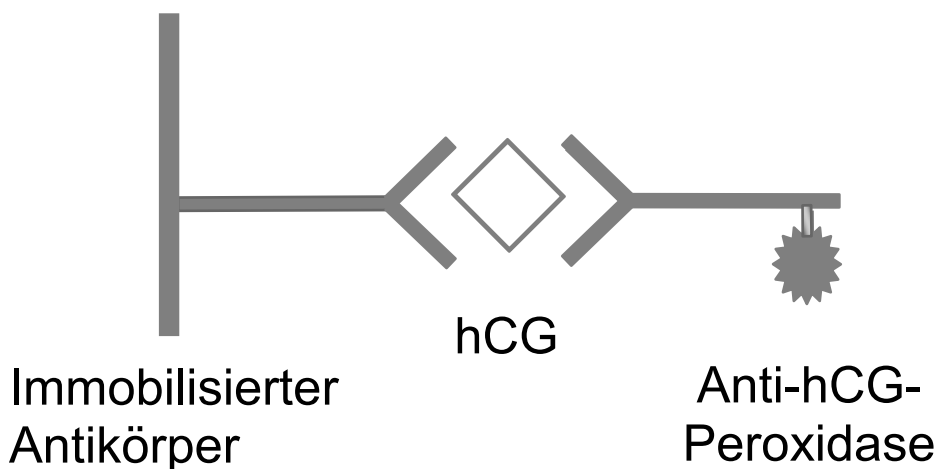


Abb. 1 Testschema

4. LAGERUNG UND STABILITÄT DES TESTKITS

Das Verfallsdatum des kompletten Testkits ist auf dem Außenetikett angegeben; das Verfallsdatum jeder einzelnen Testkomponente ist auf dem jeweiligen Etikett angegeben.

Der **Gonadotropin hCG Testkit** ist nach dem Empfang und bis zur Verwendung bei +2...+8 °C in der Originalverpackung des Herstellers zu lagern.

Eine Lagerung bei Temperaturen bis +25 °C ist maximal für 5 Tage zulässig.

Die Haltbarkeitsdauer des Kits beträgt 18 Monate.

Nach dem Öffnen ist der Testkit bei einer Lagerung von +2...+8 °C bis zu 12 Monate haltbar.

Wenn der Testkit in mehreren getrennten Experimenten verwendet wird, ist der Inhalt nach dem Öffnen wie folgt zu lagern aber die Komponenten dürfen nie länger als bis zu ihrem Ablaufdatum verwendet werden:

- Die ungenutzten Mikrotiterplatten-Streifen: in einem fest verschlossenen Druckverschlussbeutel bei einer Temperatur von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Fläschchen mit Konjugat, Kalibratoren, Kontrolle (gebrauchsfertig) bei +2...+8 °C bei +2...+8 °C für nicht länger als 12 Monate nach dem Öffnen;
- Fläschchen mit Kalibratoren und Kontrolle (gelöst aus Lyophilisat): bei einer Temperatur von +2...+8 °C für maximal 1 Monat;
- Fläschchen der konzentrierten Trial-Lösung, des Waschlösungskonzentrats, Probenverdünnungspuffer und der Stopplösung: bei einer Temperatur von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Fläschchen mit Substrat-Lösung: bei einer Temperatur von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum, **lichtgeschützt**;
- Gebrauchsfertige Waschlösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25

°C) für maximal 5 Tage oder bei +2...+8°C für maximal 4 Wochen;

- Gebrauchsfertige Trial-Lösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) für maximal 5 Tage.

Beschädigte Testkits

Im Falle einer schweren Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss Astra Biotech GmbH schriftlich innerhalb einer Woche nach dem Empfang der Ware informiert werden. Der Gebrauch stark beschädigter Komponenten für einen Testlauf wird nicht empfohlen.

5. PROBENGWINNUNG UND -LAGERUNG

Blut durch Venenpunktion entnehmen. Nach der Gerinnung wird das Serum durch Zentrifugation abgetrennt.

Es ist nicht zulässig, für eine Analyse Blutplasma, hämolysiertes (hell rot) oder lipämischer (milchig) Serum sowie Natriumazid-haltige Serumproben zu benutzen.

Die Proben sind bei der Temperatur von +2...+8 °C nicht länger als 2 Tage zu lagern. Bei Notwendigkeit einer dauerhaften Aufbewahrung wird empfohlen, die Probe zu aliquotieren und bei Temperatur von ≤ -20 °C gefroren zu lagern. Ein wiederholtes Einfrieren ist zu vermeiden.

6. REFERENZWERTE

Mit Hilfe des **Gonadotropin hCG Testkits** wurden 200 Blutserumproben, die von 9-11 Uhr morgens von gesunden 18-40-Jährigen untersucht. Der hCG-Konzentrationsbereich lag bei 0 - 10 IU/l.

Die erwarteten hCG-Werte im Blutserum schwangerer Frauen zu verschiedenen Schwangerschaftszeitpunkten und die empfohlenen Verdünnungen sind in Tabelle 1 dargestellt. Der angegebene Bereich dient jedoch nur als eine Orientierungshilfe.

Es wird ausdrücklich empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Referenzbereich für die hCG-Normkonzentrationen bestimmt.

Tab. 1

Zeitpunkt Schwangerschaft (Woche)	Median (IU/l)	Referenzbereich der hCG-Konzentration (IU/l)	Empfohlene Proben-Verdünnung
2	150	50–300	unverdünnt
3–4	2 000	1 500–5 000	1: 20
4–5	20 000	10 000–30 000	1:400
5–6	50 000	20 000–100 000	1:400
6–7	100 000	50 000–200 000	1:400 und 1:2000
7–8	80 000	40 000–200 000	1:400 und 1:2000
8–9	70 000	35 000–140 000	1:400
9–10	65 000	32 500–130 000	1:400
10–11	60 000	30 000–120 000	1:400
11–12	55 000	27 500–110 000	1:400
13–14	50 000	25 000–100 000	1:400
15–16	40 000	20 000–80 000	1:400
17–21	30 000	15 000–60 000	1:400

7. QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, Kontrollproben entsprechend der nationalen und regionalen Vorschriften zu benutzen. Der Einsatz der Kontrollproben sichert die Tag-zu-Tag Gültigkeit der Ergebnisse.

8. REAGENZIVORBEREITUNG

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) gebracht und gründlich gemischt werden.

MP Mikrotiterplatte

Die Verpackung mit der **Mikrotiterplatte** vor der Öffnung mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) lagern und anschließend wie folgt vorbereiten:

- Notwendige Anzahl der Streifen in den Rahmen einsetzen. Die unbenutzten Streifen in einen Druckverschlussbeutel legen und gut verschließen.

CAL CONTROL Kalibratoren und Kontrolle

Flüssige Kalibratoren und die flüssige Kontrolle sind gebrauchsfertig.

Die lyophilisierten Kalibratoren und die Kontrolle wie folgt vorbereiten:

- Durch leichtes Klopfen auf den Deckel wird der Feststoff vom Flaschenrand gelöst.
- Die Fläschchen werden vorsichtig geöffnet und die Deckelkappen umgedreht auf eine trockene und saubere Oberfläche gelegt.
- 0,5 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser wird jeweils in die lyophilisierten Kalibratoren und die Kontrolle

pipettiert, diese wieder mit dem jeweiligen Deckel verschlossen und 10 Minuten bei Raumtemperatur ohne Mischen inkubiert.

- Danach unter Vermeidung einer Schaumbildung sorgsam rühren bis der Feststoff komplett gelöst ist. Weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur unter periodischem Schütteln inkubieren. Es darf kein Feststoff im Deckel oder an den Wänden der Fläschchen zurückbleiben.

WASH P Waschlösung

Zubereitung der benötigten Menge der **Waschlösung** durch 20fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem oder deionisiertem Wasser:

5 ml **WASH P** **20X** + 95 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

SUB **Substrat** vor direktem Licht schützen.

9. PROBENVORBEREITUNG

Proben auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) bringen und sorgfältig mischen, um Homogenität zu erreichen.

Sollte die erwartete hCG-Konzentration der Proben höher als die des Kalibrators 5 sein, werden die Proben sowohl beim manuellen Gebrauch als auch beim automatisierten Test entsprechend jeweiliger Gebrauchsanweisung 20fach, 400fach oder 2000fach mit dem Probenverdünnungspuffer verdünnt (siehe Tab. 1 für empfohlene Verdünnung).

Beispiel einer Verdünnung für den manuellen Gebrauch:

Probe 1 (20fache Verdünnung):

190 µl Probenverdünnungspuffer **DIL** + 10 µl Serumprobe;

Probe 2 (400fache Verdünnung):

190 µl Probenverdünnungspuffer **DIL** + 10 µl Probe 1;

Probe 3 (2 000fache Verdünnung):

160 µl Probenverdünnungspuffer **DIL** + 40 µl Probe 2.

Vortexen oder gründlich mischen.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

10.1 Kalibrierung:

Der **Gonadotropin hCG Testkit** wurde gegen den dritten internationalen Standard der WHO 75/537 kalibriert.

10.2 Spezifität:

Die Kreuzreaktivität der beiden monoklonalen Antikörper dieses Testkits mit TSH, FSH und LH ist vernachlässigbar.

10.3 Analytische Sensitivität:

Die analytische Sensitivität des **Gonadotropin hCG Testkits**, d.h. die minimale Konzentration, die sich vom Kalibrator 0 sicher unterscheiden lässt, beträgt 5 IU/l (manueller Test) und 2 IU/l (automatisierter Test „Alisei“).

Zur Ermittlung wurde der Mittelwert einer 10fach-Bestimmung der OD des Kalibrators 0 unter Berücksichtigung der Standardabweichung (+ 2 SD) gebildet.

10.4 Messbereich:

Der **Gonadotropin hCG Testkit** ist validiert für die Detektion eines hCG-Konzentrationsbereiches (ohne Verdünnung) von 5-500 IU/l (für den manuellen Test) und 2-500 IU/l (für den automatisierten Test "Alisei") validiert.

10.5 Hook-Effekt:

Der High-Dose-Hook-Effekt wurde durch Aufstocken des Kalibrator 0 mit Antigen bestimmt. Der High-Dose-Hook-Effekt des **Gonadotropin hCG Kits** wurde bei Konzentrationen bis zu 400 000 IU/l nicht beobachtet.

10.6 Intra-Assay und Inter-Assay Varianz:

Um einen **Intra-Assay Variationskoeffizienten** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben, jeweils in 9fach-Bestimmung untersucht. Die Testresultate sind in der Tabelle dargestellt:

Manuelles Testkit

Probe	Mittlere hCG-Konzentration, IU/l	Intra-Assay VK	
		SD	VK, %
1	13,0	0,81	6,2
2	22,3	1,69	7,6
3	45,5	2,91	6,4
4	62,8	3,71	5,9
5	98,9	5,14	5,2
6	164	7,54	4,6
7	384	15,4	4,0
8	434	18,7	4,3

Alisei Testkit

Probe	Mittlere hCG-Konzentration, IU/l	Intra-Assay VK	
		SD	VK, %
1	9,8	0,75	7,7
2	27,8	2,06	7,4
3	53,7	2,73	5,1
4	80,9	1,64	2,0
5	133,5	6,77	5,1
6	274,3	14,34	5,2
7	380,8	16,12	4,2
8	474,6	16,22	3,4

Um einen **Inter-Assay Variationskoeffizient** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben dreimal mit einem Intervall von einer Woche von verschiedenen Anwendern untersucht. Jede Probe wurde 9 Mal gemessen. Die Testergebnisse sind in der Tabelle dargestellt:

Manuelles Testkit

Probe	Mittlere hCG-Konzentration, IU/l			Inter-Assay VK	
	1. Test	2. Test	3. Test	SD	VK, %
1	19,3	16,4	18,6	1,51	8,4
2	54,0	58,2	51,1	3,57	6,6
3	112	127	121	7,6	6,3
4	157	164	148	8,2	5,3
5	243	251	247	4,2	1,7
6	354	340	369	14,4	4,1
7	412	447	405	22,4	5,3
8	436	470	459	17,4	3,8

Alisei Testkit

Probe	Mittlere hCG-Konzentration, IU/l			Inter-Assay VK	
	1. Test	2. Test		1. Test	2. Test
1	9,8	10,3	8,9	0,71	7,3
2	27,8	25,4	25,6	1,33	5,1
3	53,7	50,1	48,3	2,75	5,4
4	80,9	81,4	87,0	3,39	4,1
5	133,5	154,6	143,9	10,55	7,3
6	274,3	262,9	250,7	11,80	4,5
7	380,8	392,7	371,2	10,77	2,8
8	474,6	500,0	489,9	12,79	2,6

11. GRENZEN DER METHODE

Eine klinische Diagnose sollte nicht allein mit Hilfe der Ergebnisse einer einzelnen diagnostischen Methode erhoben werden. Zur Diagnosestellung sollten vom Arzt alle verfügbaren klinischen und Laborbefunde berücksichtigt werden.



12. VORSICHTSMAßNAHMEN

- **Der Testkit ist ausschließlich zum in vitro–Gebrauch bestimmt.** Um zuverlässige Testergebnisse zu erhalten, ist die Arbeitsanleitung strikt einzuhalten. Diese Gebrauchsanweisung ist nur für den vorliegenden Testkit mit dem aufgeführten Inhalt gültig. Jeglicher Austausch der Kitkomponenten ist durch die CE-Regularien nicht gestattet.

- Der Testkit oder einzelne Kit-Komponenten dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
Die Haltbarkeit der verdünnten Komponenten muss ebenfalls berücksichtigt werden.
- Das Mischen oder die gleichzeitige Verwendung von Reagenzien verschiedener Testchargen, ausgenommen Substrat, Stopp- und Waschlösung, ist nicht gestattet.
- Substrat, Stopplösung und Waschlösung anderer Hersteller nicht verwenden.
- Nur "P"-gekennzeichnete Astra Biotech-Waschlösung benutzen.
- Die Stopplösung ist eine 1 N Salzsäure (HCl-Lösung). Vermeiden Sie Haut- und Schleimhautkontakt. Bei Kontakt den betroffenen Bereich mit fließendem Wasser spülen und gegebenenfalls einen Arzt aufsuchen.
- Bitte folgende bekannte Verfahrensregeln beachten:
 - Reagenzien unmittelbar nach dem Waschen in die Kavitäten pipettieren;
 - Kontamination der Lösungen vermeiden;
 - Bei teilweiser Nutzung des Testkits nur benötigtes Volumen in ein gesonderten Behälter geben;
 - Nicht benutzte Reagenzien NICHT zurück in die ursprünglichen Original-Fläschchen füllen;
 - Direkte Sonneneinstrahlung während der Inkubation vermeiden;
 - Reagenzien in gleicher Reihenfolge pipettieren, um Unterschiede in den Reaktionszeiten zwischen den Kavitäten zu vermeiden.

- Die gesamte Pipettierzeit für Kalibratoren, Kontrolle und Proben darf 15 Minuten nicht überschreiten;
- Die Temperatur der Inkubation aller immunologischen Reaktionen muss bei +37 °C liegen;
- Den Boden der Kavitäten nicht berühren;
- Kalibratoren müssen bei jedem Testlauf gemessen werden. Es wird außerdem empfohlen, die hCG-Konzentration der Kontrolle jedes Mal zu bestimmen;
- Entfernen Sie die Klebeschutzfolie vorsichtig um eine Kontamination zu vermeiden und verwenden Sie dieselbe Klebeschutzfolie nicht erneut.
- Die TMB-Lösung sollte farblos sein. Eine helle Färbung der Lösung ist zulässig. Vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung des Substrates.
-  Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg (Hepatitis B surface Antigen) bzw. Antikörper gegen HIV („Human Immunodeficiency Virus“) und HCV (Hepatitis C Virus) ein negatives Ergebnis. Dennoch kann das Vorhandensein infektiöser Erreger durch keinen Test mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien und Proben sollten deshalb immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
-  Nach dem Gebrauch werden Streifen, Kalibratoren, Kontrollen, Proben und alle Verbrauchsmittel (Reaktionsgefäße, Fläschchen, Handschuhe, Pipettenspitzen), die mit den Proben während der Bearbeitung oder Lagerung in Kontakt kamen, separat gesammelt und autoklaviert. Pipettenspitzen können anstelle

des Autoklavierens durch Inkubation in desinfizierenden Substanzen sterilisiert werden. Nach der Sterilisation können alle Komponenten und Einmal-Artikel als nicht gefährlicher Müll behandelt werden. Andere Kitbestandteile werden auf konventionelle Weise entsorgt.

-  Während der manuellen Waschprozedur Überstände nicht in den Abfluss geben, sondern in einen Behälter mit Desinfektionsmittel.
-  Beim Umgang mit potentiell infektiösem Material müssen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:
 - Im Laborraum nicht rauchen, nicht trinken und nicht essen;
 - Schutzhandschuhe verwenden;
 - Nie mit dem Mund pipettieren;
 - Verspritzen von Flüssigkeiten vermeiden. Sollte doch Flüssigkeit vergossen worden sein, diese sofort aufnehmen und die verschmutzte Oberfläche desinfizieren.
- Bei der Verwendung des Testkits müssen die Anforderungen der guten Laborpraxis (GLP) inklusive aller Richtlinien beachtet werden.



Der Testkit beinhaltet Reizstoffe (**CONJ**, **DIL**, **CAL**, **CONTROL**). Daher sollten folgende Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:

- P261 - Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden;
- P272 - Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen;

- P280 - Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen;
- P302+P352 - Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen;
- P333+P313 - Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen;
- P363 - Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen;
- P501 - Inhalt/Behälter den nationalen Vorschriften entsprechend der Entsorgung zuführen.

Die Vorsichtsmaßnahmen entsprechen der Verordnung EG Nr. 1272/2008.

13. MANUELLER TEST (REF 22-01)

13.1 Packungsinhalt

MP	Mikrotiterplatte: Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten) beschichtet mit monoklonalen Anti-hCG-Antikörpern	1 Platte
CONJ	Konjugat: Lösung aus monoklonalen Anti-hCG-Antikörpern konjugiert mit HRP	18 ml, gebrauchsfertig
0-5 CAL	hCG Kalibratoren: Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter hCG-Konzentration- 0; 15; 50; 125; 250; 500 IU/l (ungefähre Werte - verwenden Sie die Daten nicht für die Auswertung des Assays). Die exakten Lot spezifischen hCG-Konzentrationen der Kalibratoren sind im Quality Control Sheet angegeben.	6 Fläschchen mit je 0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
CONTROL	hCG Kontrolle: Protein-Puffer oder Lyophilisat mit definierter hCG-Konzentration. Der Lot spezifische hCG-Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben.	0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
SUB	Substrat (TMB-Lösung): 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml, gebrauchsfertig
WASH P 20X	Waschlösung P, 20x, konzentriert: Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 560 ml Lösung.	2x14 ml, konzentriert
STOP	Stopplösung: 1 N HCl-Lösung	14 ml, gebrauchsfertig

DIL	Probenverdünnungspuffer	20 ml, gebrauchsfertig
	Klebeschutzfolie	2x 1 Folie (optional)

13.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- geeichte, verstellbare Einkanal-Pipetten mit Einweg-Pipettenspitzen;
- geeichte, verstellbare 8-Kanal-Pipette mit Einweg-Pipettenspitzen;
- Mikrotiterplatten-Inkubator (+37 °C) oder Mikrotiterplatten-Inkubator/-Schüttler (+37 °C, 500-800 rpm);
- Equipment zum manuellen oder automatischen Waschen;
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten (450 nm);
- Vortexer;
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser;
- Messzylinder, Becherglas;
- Labor-Handschuhe;
- Behälter zum Pipettieren mit 8-Kanal-Pipette;
- Desinfektionsmittel;
- Absorbierendes Material (zum manuellen Waschen).

13.3 Testablauf

Der **Gonadotropin hCG Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine Doppelbestimmung von

40 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und 1x Blank (=OD der TMB-Lösung).

13.3.1 Assay-Durchführung

Assay-Protokoll 1

(siehe: Assay-Schema für Assay-Protokoll 1, Abschnitt 13.5)

- A. 150 µl Konjugat [CONJ]** in alle Kavitäten **außer A1-A2** (Blank) pipettieren.
- B. 50 µl der Kalibratoren [CAL], Kontrolle [CONTROL] und Serumproben in Zweifachbestimmung** in entsprechende Kavitäten pipettieren. **Kavitäten A1-A2 bleiben frei (Blank).**

Anmerkung: *Die Gesamtzeit der Pipettiertschritte darf 15 Minuten nicht überschreiten, da es somit zu einer erheblichen Variation der Inkubationszeit zwischen den Proben kommt und das Testergebnis somit unzuverlässig sein kann.*

Anmerkung: *Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, nutzen sie diese jetzt um die Mikrotiterplatten zu verschließen.*

- C. 60 Minuten** bei **+37 °C** unter Schütteln (**500 bis 800 rpm**) inkubieren.

Anmerkung: *Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, entfernen sie diese nun vorsichtig von der Mikrotiterplatte.*

- D. 5x**, wie unten beschrieben, waschen.
- E. 100 µl Substrat [SUB]** in jede Kavität pipettieren; entweder Streifen bei **Raumtemperatur (+18...+25 °C) im Dunkeln**

für **15–30 Minuten** (abhängig von der Farbintensität) oder für **10 Minuten bei +37 °C** unter Schütteln (**500-800 rpm**) inkubieren.

F. 100 µl Stopplösung STOP in alle Kavitäten (auch Blank) in selber Reihenfolge und Geschwindigkeit wie das Substrat pipettieren und für **1-2 Minuten** bei **Raumtemperatur schütteln**.

G. OD-Messung bei 450 nm innerhalb von 20 Minuten.

Assay Protokoll 2: ohne Thermoschüttler

(siehe: Assay-Schema für Assay-Protokoll 2, Abschnitt 13.6)

A. 150 µl Konjugat CONJ in alle Kavitäten **außer A1-A2** (Blank) pipettieren.

B. 50 µl der Kalibratoren CAL, Kontrolle CONTROL und **Serumproben in Zweifachbestimmung** in entsprechende Kavitäten pipettieren. **Kavitäten A1-A2 bleiben frei (Blank).**

Anmerkung: *Die Gesamtzeit der Pipettiertschritte darf 15 Minuten nicht überschreiten, da es somit zu einer erheblichen Variation der Inkubationszeit zwischen den Proben kommt und das Testergebnis somit unzuverlässig sein kann.*

Anmerkung: *Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, nutzen sie diese jetzt um die Mikrotiterplatten zu verschließen.*

C. 90 Minuten bei +37 °C inkubieren (vorher 1-2 Minuten bei RT schütteln).

Anmerkung: Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, entfernen sie diese nun vorsichtig von der Mikrotiterplatte.

D. 5x, wie unten beschrieben, waschen.

E. 100 µl Substrat SUB in jede Kavität pipettieren; entweder Streifen bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) im Dunkeln für 15–30 Minuten abhängig von der Farbintensität inkubieren.

F. 100 µl Stopplösung STOP in alle Kavitäten (auch Blank) in selber Reihenfolge und Geschwindigkeit wie das Substrat pipettieren und für 1-2 Minuten bei Raumtemperatur schütteln.

G. OD-Messung bei 450 nm innerhalb von 20 Minuten.

13.3.2 Waschen

Es wird empfohlen, ein automatisches Mikroplatten-Waschgerät mit 5 Waschzyklen und einem jeweiligen Waschvolumen von 300 µl pro Kavität und Zyklus zu benutzen.

Die Waschprozedur kann ebenso manuell durchgeführt werden:

- Überstand aus den Kavitäten in einem Behälter mit Desinfektionsmittel verwerfen;
- 300 µl der vorbereiteten Waschlösung (Abschnitt 8) in jede Kavität geben, die Platte für 5-10 Sekunden sorgfältig schütteln und den Überstand verwerfen, 5 Mal wiederholen;
- Ausklopfen der Kavitäten auf einer saugfähigen Unterlage bis alle Flüssigkeit entfernt ist.

13.4 Datenverarbeitung

Bei Benutzung eines Photometers, welcher keine Nullstellung erlaubt, wird der OD-Wert der Kavitäten A1-A2 (Blank) von allen anderen OD-Werten vor weiterer Kalkulation subtrahiert.

Beispiel:

OD (Kalibrator 5) gemessen = 2,28 und OD (Blank) = 0,06;

OD (Kalibrator 5) berechnet = $2,28 - 0,06 = \underline{2,22}$

13.4.1 Datenverlässlichkeit (für OD gemessen bei 450 nm)

Die Daten sollten folgende Kriterien erfüllen:

- Mittelwert der OD (der Kavitäten A1-A2) $\leq 0,100$;
- Mittelwert der OD des Kalibrators 5 $\geq 1,500$ (nach Blank Subtraktion);
- Konzentration der Kontrolle muss innerhalb des Bereiches liegen, welcher auf dem Quality Control Sheet angegebenen ist.

Sollten die gemessenen Daten die Bedingungen nicht erfüllen, werden die Resultate als unzulässig betrachtet und der Test sollte wiederholt werden.

13.4.2 Quantitative Bestimmung

Eine spezialisierte Software zur quantitativen Bestimmung wird empfohlen. Die Mittelwerte der OD der Kalibratoren bei 450 nm werden gegen deren jeweilige hCG-Konzentration mittels **4PL oder 5PL Näherung** (Abb. 2 Typische Standardkurve) aufgetragen. Die hCG-Konzentration der Serumproben wird mit Hilfe der Standardkurve berechnet.

Eine Extrapolation der Standardkurve für hCG-Konzentrationswerte, die die Konzentration des Kalibrators 5 überschreiten, ist nicht zulässig. In diesem Fall sollte die Probe mit dem Probenverdünnungspuffer 20-, 400 oder 2000fach verdünnt und erneut getestet werden.

Die gemessene Konzentration der verdünnten Probe muss mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

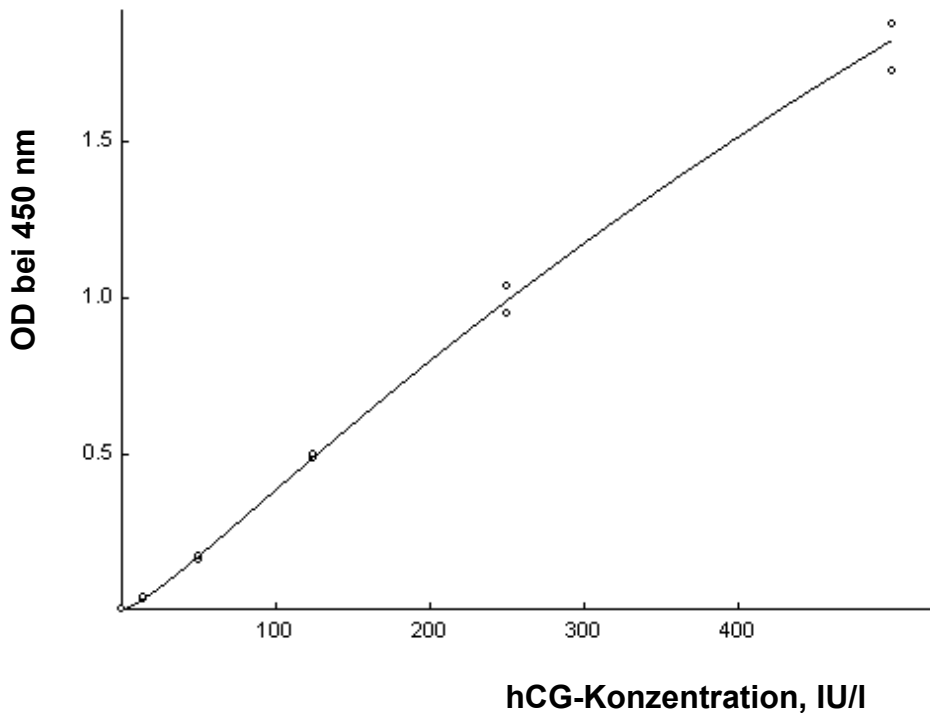


Abb.2 Typische Standardkurve

Beispielstandardkurve! Nicht zur Auswertung benutzen

13.5 Assay-Schema zum Assay-Protokoll 1

Reagenz \ Kavität	«Blank»	CAL CONTROL	Probe
CONJ	–	150 µl	150 µl
CAL CONTROL	–	50 µl	–
Probe	–	–	50 µL
Inkubation No.1	60 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
WASH P (verdünnt)	5 x 300 µl		
SUB	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubation No.2	15–30 Min, +18...+25 °C, im Dunkeln		
	10 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
STOP	100 µl	100 µl	100 µl
Rühren	1–2 Min, +18...+25 °C		
OD-Messung	450 nm		
Berechnung	Spezielle Software		

13.6 Assay-Schema zum Assay-Protokoll 2: ohne Thermoschüttler

Reagenz	Kavität		
	«Blank»	CAL	Probe
CONJ	–	CONTROL 150 µl	150 µl
CAL CONTROL	–	50 µl	–
Probe	–	–	50 µL
Inkubation No.1	90 Min, +37 °C (vorher 1-2 Minuten bei RT schütteln)		
WASH P (verdünnt)	5 x 300 µl		
SUB	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubation No.2	15–30 Min, +18...+25 °C, im Dunkeln		
STOP	100 µl	100 µl	100 µl
Rühren	1–2 Min, +18...+25 °C		
OD-Messung	450 nm		
Berechnung	Spezielle Software		

14. AUTOMATISIERTER TEST (REF 22-01 A)

14.1 Packungsinhalt

MP	Mikrotiterplatte: Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten) beschichtet mit monoklonalen Anti-hCG-Antikörpern	1 Platte
CONJ	Konjugat: Lösung mit monoklonalen Anti-hCG-Antikörpern konjugiert mit HRP	18 ml, gebrauchsfertig
0-5 CAL	hCG Kalibratoren: Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter hCG-Konzentration- 0; 15; 50; 125; 250; 500 IU/l (ungefähre Werte- bitte nicht für die Auswertung von realen Testdaten verwenden). Für Lot spezifische hCG-Konzentrationen siehe Werte im Quality Control Sheet.	6 Fläschchen mit je 0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
CONTROL	hCG Kontrolle: Protein-Puffer oder Lyophilisat mit definierter hCG-Konzentration. Der hCG-Konzentrationsbereich ist auf dem Quality Control Sheet angegeben.	0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
WASH P 20X	Waschlösung P, 20x konzentriert: Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 1000ml Lösung.	50 ml, konzentriert
SUB	Substrat (TMB-Lösung): 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml, gebrauchsfertig
STOP	Stopplösung: 1 N HCl-Lösung	19 ml, gebrauchsfertig
TRIAL 5000X	Trial-Lösung, 5000x konzentriert: Reinigungslösung	Muss separat bestellt werden
DIL	Probenverdünnungspuffer: Protein-Puffer	2 × 50 ml, gebrauchsfertig

14.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- ELISA-Automat "Alisei";
- Polypropylen Röhrchen 12x75, Volumen: 5,5 ml;
- **TRIAL 5000X** Trial-Lösung, 5000x konzentriert*;
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser,
- Laborhandschuhe.

14.3 Testverfahren

Der **Gonadotropin hCG Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine Einzelbestimmung von 88 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und für die Bestimmung des Blank (=OD der TMB-Lösung).

14.3.1 Reagenzienvorbereitung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (+18...+25  C) gebracht und gründlich gemischt werden.

Anmerkung: *Vorbereitung der anderen Reagenzien siehe Abschnitt 8.*

TRIAL Trial-Lösung zum Reinigen der gerät-internen Hydraulikleitungen und Nadeln des ELISA-Automaten.

Zubereitung der benötigten Menge der Trial-Lösung vor der Analyse durch 5000fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem oder deionisiertem Wasser:

2 ml **TRIAL 5000X** + 9998 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

* Reagenz ist nicht Teil des Kits und kann separat bezogen werden.

14.3.2 Testablauf des automatisierten Tests

Bei Benutzung des ELISA-Automaten „Alisei“ ist die entsprechende Gebrauchsanweisung des Gerätes zu verwenden.

Die Durchführung des Enzymassays mit „Alisei“ ist komplett automatisch: Pipettieren der Reagenzien, Waschschriffe, Inkubation, OD-Messung und Analyse der Testergebnisse. Das Programm zur Berechnung der hCG-Konzentration ist im Gerät ebenfalls enthalten.

14.4 Datenverarbeitung

14.4.1 Datenverlässlichkeit (für OD gemessen bei 450 nm)

Siehe Kriterien des Abschnittes **13.4.1**.

14.5 Vorsichtsmaßnahmen

- Bei mehrfacher Nutzung des Testkit in einem ELISA-Automaten müssen die Reagenzien aufgrund der Verdunstung unmittelbar nach Beenden des Pipettiervorganges aus dem Automaten genommen werden, um einen möglichen Verlust durch Verdunstung zu vermeiden. Die Reagenzien sind in den Kühlschrank zu stellen.
- Die Rekalibrierung anhand der Standardkurve eines Testkits mit anderer Lotnummer ist nicht zulässig.

2. INTENDED USE

Gonadotropin hCG kit is provided for the **quantitative determination of human chorionic gonadotropin (hCG) in human serum.**

This test has 2 complete sets:

REF 22-01 for manual use,

REF 22-01 A must be used with ELISA automatic instrument “Alisei” manufactured by NEXT Level S.r.l. hereinafter referred to as analyser “Alisei”.

Note 1: The manual test is intended for prenatal diagnostics during 1st and 2nd pregnancy trimester as well as for oncology testing.

“Alisei” test is intended only for 2nd trimester screening.

Instructions for use:

Section 13 for manual test,

Section 14 for *analyser* “Alisei”.

Note 2: *Take into account that calibrators’ nominals can be different for manual and automatic test kits.*

Note 3: *We guarantee applications of test*

REF 22-01 A *only on analyser “Alisei”,*

REF 22-01 *only for manual use.*

While using non predefined methods of use, it is under end user responsibility, to make sure that it was appropriately tested for ELISA kits.

HCG is a glycoprotein hormone that consists of two subunits (α and β). Quantitative measurement of hCG is regarded as the most reliable indicator for early diagnostics of pregnancy.

Alteration in serum level of hCG in pregnant women is an important method for prenatal diagnostics of some inborn diseases. Besides, this method is widely used in obstetrics for diagnostics of multiple pregnancy, ectopic pregnancy and the threatening abortion. Though hCG presence in serum is usually associated with normal pregnancy, increased level of hCG may be also detected in patients with teratogenic carcinomas or throphoblastic neoplasias. Less frequently hCG concentration is increased in the case of ectopic synthesis due to testis, breast, intestinal, lung or prostate cancer. hCG concentration in patients with some particular forms of cancer may exceed 100000 IU/L. Measurement of hCG is an important method for diagnostics and monitoring of such diseases.

3.PRINCIPLE OF TEST

Gonadotropin hCG kit is a “sandwich” type of solid-phase enzyme immunoassay, based on two monoclonal antibodies that are specific for different epitopes of hCG β -subunit. One of these antibodies is conjugated with horseradish peroxidase (HRP); the other is coated onto the inner surface of microwells. hCG molecules from the serum sample bind to both immobilized antibody and anti-hCG-peroxidase conjugate. Then the wells are washed with wash solution to remove any material not bound on the inner surface of the wells. Quantity of the bound conjugate is directly proportional to hCG level in tested sample.

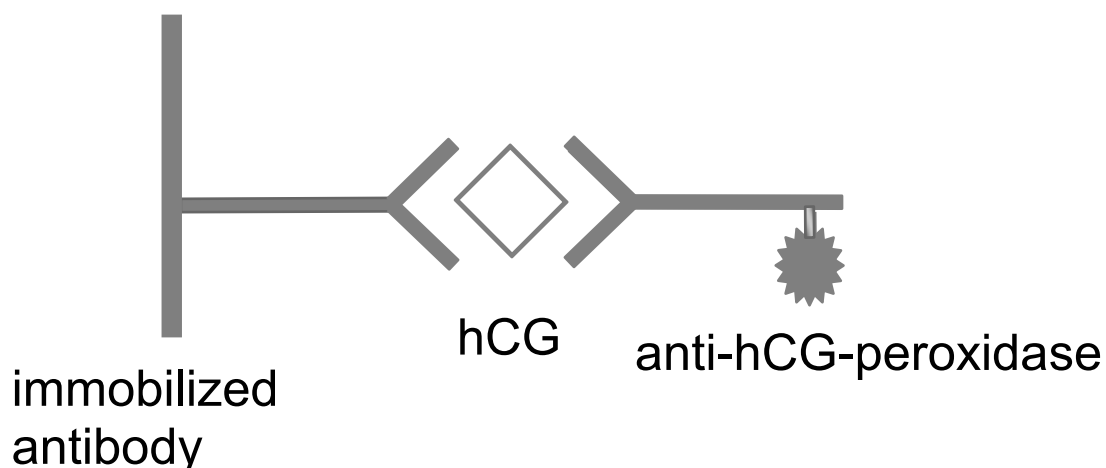


Fig. 1 Assay scheme

During the incubation with TMB solution the colour is developing. The intensity of the colour is directly proportional to hCG concentration in specimens. hCG concentration in the patient sample is read from a standard curve that is processed in each assay.

4.STORAGE AND STABILITY OF THE KIT

The expiration date of the kit is printed on the box label; the expiration date for each component is printed on the respective label.

Gonadotropin hCG kit should be stored at +2...+8 °C upon receipt, preferably in the original kit box, until the expiration date. Storage at +25 °C is allowed but for no more than 5 days.

Shelf life of the kit is 18 months.

After initial opening the kit is stable for 12 months if stored at +2...+8 °C.

If used in several separate experiments, after initial opening kit contents should be stored as follows:

- unused strips: in a firmly closed resealable zipper bag at +2...+8 °C until the expiration date;
- vials with conjugate, calibrators and control (ready-to-use): at +2...+8 °C for 12 months; vials with calibrators and control (reconstituted): at +2...+8 °C for no more than 1 month after opening;
- vials with concentrated Trial, concentrated wash solution, sample diluent and stop solution: at +2...+8 °C until the expiration date;
- vial with substrate: at +2...+8 °C until the expiration date, protected from light;
- wash solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days or at +2...+8°C for no more than 4 weeks in a firmly closed bottle;
- Trial solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days in a firmly closed bottle.

Damaged Test Kits

In case of any severe damage of the test kit or components, Astra Biotech GmbH has to be informed in writing, during one week after receiving the kit. Usage of severely damaged single components for a test run is not recommended.

5. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

Collect blood by venipuncture. After clotting, the serum is separated by centrifugation.

Do not use plasma, haemolyzed (bright red) or lipaemic (milky) serum samples as well as samples containing sodium azide as preservative. Store serum samples at +2...+8 °C for no

more than 2 days. Aliquot and freeze the samples for a longer storage (≤ -20 °C). Avoid repeated freezing.

6. EXPECTED VALUES

Serum samples collected between 9 and 11 a.m. from 200 apparently healthy people (both males and females) at the age of 18–40, were assayed with **Gonadotropin hCG kit**. hCG concentration range was 0–10 IU/L.

Expected hCG concentrations in sera of pregnant women at different terms of normal gestation and recommended sample dilutions are shown in Table 1. These limits should be considered as guidelines only. It is highly recommended for each laboratory to determine its own reference range of hCG concentrations.

Table 1

Gestation period after the LMP (weeks)	Median (IU/L)	Reference range of hCG concentration (IU/L)	Recommended sample dilution
2	150	50–300	Without dilution
3–4	2 000	1 500–5 000	1: 20
4–5	20 000	10 000–30 000	1:400
5–6	50 000	20 000–100 000	1:400
6–7	100 000	50 000–200 000	1:400 and 1:2 000
7–8	80 000	40 000–200 000	1:400 and 1:2 000
8–9	70 000	35 000–140 000	1:400
9–10	65 000	32 500–130 000	1:400
10–11	60 000	30 000–120 000	1:400
11–12	55 000	27 500–110 000	1:400
13–14	50 000	25 000–100 000	1:400

Gestation period after the LMP (weeks)	Median (IU/L)	Reference range of hCG concentration (IU/L)	Recommended sample dilution
15–16	40 000	20 000–80 000	1:400
17–21	30 000	15 000–60 000	1:400

7. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to the state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

8. REAGENT PREPARATION

Allow all the reagents to reach room temperature (+18...+25 °C), and then thoroughly stir.

MP Microplate

Keep the **microplate** at room temperature for at least 30 minutes before opening the bag. Place required number of strips onto strip holder. Place unused strips into the resealable zipper bag and reseal duly.

CAL **CONTROL** Calibrators and Control

Liquid calibrators and control are ready to use.

Prepare lyophilized calibrators and control as follows. Gently tap on the vial caps to knock off all the dry matter. Open the vials and carefully place the caps upside down on the clean dry surface. Add 0.5 mL of distilled or deionized water to each vial with lyophilized calibrators and control, close vials with the corresponding caps and leave for 10 min at room temperature without stirring. Then stir gently avoiding foaming, until the dry

matter is completely dissolved. Leave for another 10 minutes at room temperature stirring gently periodically. Make sure that no dry matter is left on the caps and walls of the vials.

WASH P Wash solution

Prepare required volume of **wash solution** by dilution of the concentrate 20-fold with distilled or deionized water. For example: 5 mL **WASH P** **20X** + 95 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

SUB Substrate

Protect **substrate** from direct light.

9. SAMPLE PREPARATION

Allow samples to reach room temperature (+18...+25 °C). Stir samples gently in order to ensure homogeneity.

If the expected hCG concentration in the sample is higher than in calibrator 5, the sample should be diluted with sample diluent 20-fold, 400-fold or 2 000-fold in concordance with instructions for use for manually before analysis or analyser "Alisei" (see the Table 1 for recommended dilution). The example of manual sample dilution as follows:

Sample 1 (20-fold dilution):

190 µL sample diluent **DIL** + 10 µL serum sample;

Sample 2 (400-fold dilution):

190 µL sample diluent **DIL** + 10 µL the Sample 1;

Sample 3 (2 000-fold dilution):

160 µL sample diluent **DIL** + 40 µL Sample 2.

Vortex or mix thoroughly.

10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY

10.1. Calibration – Traceability:

The **Gonadotropin hCG kit** was calibrated against the WHO 3rd International Standard 75/537.

10.2. Specificity:

Cross-reactivity of both monoclonal antibodies used in the assay with TSH, FSH and LH is negligible.

10.3. Analytical Sensitivity:

Analytical sensitivity of Gonadotropin hCG kit, i.e. concentration that can be distinguished from zero calibrator, is 5 IU/L (for manual test) and 2 IU/L (for analyser “Alisei”). It is defined as mean OD of 10 replicates of calibrator 0 plus 2 SD.

10.3. Measurement Range:

The **Gonadotropin hCG kits** were validated for measurement of hCG concentration within the concentration diapason (without dilution) of 5-500 IU/L (for manual test) and of 2-500 IU/L (for analyser “Alisei”).

10.4. Hook Effect:

High dose hook effect was determined by spiking calibrator 0 matrix with antigen For **Gonadotropin hCG kit** no high dose hook effect was detected for concentrations up to 400 000 IU/L.

10.6 Intra- and Inter-Assay Variation:

For Intra-Assay CV determination, 8 serum samples were assayed in 9 replicates each. The results are shown below.

Manual kit

Sample	Mean hCG concentration, IU/L	Intra-Assay CV	
		SD	CV, %
1	13.0	0.81	6.2
2	22.3	1.69	7.6
3	45.5	2.91	6.4
4	62.8	3.71	5.9
5	98.9	5.14	5.2
6	164	7.54	4.6
7	384	15.4	4.0
8	434	18.7	4.3

Alisei kit

Sample	Mean hCG concentration, IU/L	Intra-Assay CV	
		SD	CV, %
1	9.8	0.75	7.7
2	27.8	2.06	7.4
3	53.7	2.73	5.1
4	80.9	1.64	2.0
5	133.5	6.77	5.1
6	274.3	14.34	5.2
7	380.8	16.12	4.2
8	474.6	16.22	3.4

For inter-assay CV determination, 8 serum samples were assayed 3 times by different operators with 1-week interval. Each specimen was assayed in 9 replicates. The results are shown below.

Manual kit

Sample	Mean hCG concentration, IU/L			Inter-Assay CV	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	19.3	16.4	18.6	1.51	8.4
2	54.0	58.2	51.1	3.57	6.6
3	112	127	121	7.6	6.3
4	157	164	148	8.2	5.3
5	243	251	247	4.2	1.7
6	354	340	369	14.4	4.1
7	412	447	405	22.4	5.3
8	436	470	459	17.4	3.8

Alisei kit




Sample	Mean hCG concentration, IU/L			Inter-Assay precision	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	9.8	10.3	8.9	0.71	7.3
2	27.8	25.4	25.6	1.33	5.1
3	53.7	50.1	48.3	2.75	5.4
4	80.9	81.4	87.0	3.39	4.1
5	133.5	154.6	143.9	10.55	7.3
6	274.3	262.9	250.7	11.80	4.5
7	380.8	392.7	371.2	10.77	2.8
8	474.6	500.0	489.9	12.79	2.6


11. LIMITATION OF THE METHOD

Any clinical diagnosis should not be based on the results of in vitro diagnostic methods alone. To state a diagnosis, the physician is supposed to consider all the available clinical and laboratory findings.

12. SAFETY PRECAUTIONS

- **This kit is for in vitro diagnostic use only.** Operator should follow the manual closely in order to ensure reliable data. The manual is valid for the present kit only, within the listed composition. Any substitution of kit components is not allowed by CE regulations.
- Do not use kit or its components after the expiration date indicated on the label. Take into account stability period for reconstituted reagents.
- Do not mix or use together reagents from different lots of the kit except substrate, stop solution and wash solution.
- Do not use substrate, stop solution and wash solution supplied by other vendors.
- Use only “P”-labeled Astra Biotech wash solution.
- Note that stop solution is 1 N HCl solution. Avoid contacts with skin and mucosa. In case of contact rinse affected area thoroughly with plenty of water and seek medical advice.
- Take into account the following common procedural notes:
 - always pipette reagents into wells immediately after washing procedure;
 - avoid contamination of the solutions;
 - in case of partial use of the kit, dispense only required volume of the reagent into the tray;
 - do not pour unused reagents back into the original vials;
 - avoid exposure to direct sunlight during incubations;
 - always pipette reagents in the same order to minimize reaction time differences between wells; the total dispensing time for the calibrators, control and samples must not exceed 15 min;

- the incubation temperature for all the immunological reactions must be kept at +37 °C;
- do not touch the bottom of the wells.
- calibrators should be measured in each separate assay. It is also recommended to measure each time hCG concentration in the control;
- remove the adhesive foil carefully to avoid contamination and don't use the adhesive foil repeatedly.
- TMB solution should be colourless. Light colouring of solution is admissible. Avoid direct exposure of substrate to sunlight.
-  Source materials of human origin used for kit components preparation were tested and found negative for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV antibodies. However, none of known laboratory test guarantees absence of these viral agents. Therefore, all kit components and patient's samples should be handled as potentially hazardous.
-  After usage strips, calibrators, control, specimens and all consumables which contacted with specimens during handling, storage or assay (tubes, vials, gloves, pipette tips etc.) should be collected separately and sterilized by autoclaving. Instead of autoclaving pipette tips may be sterilized by disinfectant treatment. After sterilization all components and expendable materials may be utilized as non-dangerous garbage. Other components of the kit should be discarded into conventional garbage.
-  During manual washing procedure do not discard the contents of the wells directly to drainage. Use a container with disinfectant solution.

-  As the kit contains potentially hazardous material, the following precautions should be taken:
 - do not smoke, eat or drink while performing the assay;
 - always use protective gloves;
 - never pipette material by mouth;
 - in case of spilling, wipe up the spills promptly and wash affected area thoroughly using decontaminant.
- GLP including all general and individual regulations should be applied for the kit usage.



As the kit contains irritant (**CONJ**, **DIL**, **CAL**, **CONTROL**), the following precautions should be observed:

- P261 - Avoid breathing spray;
- P272 - Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace;
- P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection;
- P302+P352 - IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water;
- P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention;
- P363 - Wash contaminated clothing before reuse;
- P501 - Dispose of contents/container in accordance with national regulation.

Precautionary statements according to Regulation EC No 1272/2008.

13. MANUAL TEST (REF 22-01)

13.1. Material Provided

MP	Microplate: 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-hCG monoclonal antibodies	1 pcs
CONJ	Conjugate: solution contains anti-hCG monoclonal antibodies conjugated with HRP	18 mL, ready to use
0-5 CAL	hCG calibrators: protein-based solution or lyophilized preparations containing known hCG concentrations – 0; 15; 50; 125; 250; 500 IU/L (approximate values – do not use for evaluation of real assay data). For lot specific hCG concentrations, see values in the Quality Control Sheet	6 vials, 0.5 mL each; ready to use or lyophilized
CONTROL	hCG control: protein-based solution or lyophilized preparation containing known hCG concentration. For lot specific ranges of hCG concentration see values in the Quality Control Sheet.	0.5 mL, ready to use or lyophilized
SUB	Substrate (TMB solution): 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
WASH P 20X	Wash solution P, 20X concentrated: surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 560 mL of solution	2x14 mL, concentrated
STOP	Stop solution: 1 N HCl solution	14 mL, ready to use
DIL	Sample diluent	20 mL, ready to use
	Adhesive foil	2x1 pcs, (optional)

13.2. Equipment and Materials Required but not provided

- 1-channel calibrated variable precision pipettes, with disposable tips;
- 8-channel calibrated variable precision pipette, with disposable tips;
- microplate incubator (+37 °C) or microplate incubator-shaker (+37°C, 500–800 rpm);
- manual or automatic equipment for rinsing wells;
- calibrated microplate reader (450 nm);
- vortex tube mixer;
- deionized or distilled water;
- graduated beaker and cylinder of appropriate volume;
- latex or plastic gloves;
- trays for pipetting reagents with 8-channel pipette;
- disinfectant;
- absorbent material (for manual wash).

13.3. Test Procedure

The **Gonadotropin hCG kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for 40 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in duplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

13.3.1 Assay Procedure

Assay Protocol 1

(see also Assay scheme to Assay Protocol 1, section 13.5)

All samples should be tested in duplicates.

- A.** Pipette **150 µL conjugate [CONJ]** into each well **except wells A1-A2 (blank)**;
- B.** Pipette **50 µL** of calibrators **[CAL]**, control **[CONTROL]** and **patient's samples in duplicates**, into the respective wells; **except wells A1-A2.**

Note: *total time of dispensing must not exceed 15 minutes, otherwise the test result may be unreliable, because the time of incubation will substantially vary for different samples.*

Note: *If an adhesive foil is used, put it now onto the plate to seal the cavities.*

- C.** Incubate for **60 minutes at +37 °C while shaking (500–800 rpm).**

Note: *If an adhesive foil is used, remove it now from the plate.*

- D.** Wash 5 times, as described below.
- E.** Pipette **100 µL substrate [SUB]** into each well (including blank); incubate strips **at room temperature (+18...+25 °C) in the dark for 15-30 minutes** (depending on the colour intensity) or **10 minutes while shaking (500-800 rpm) at +37 °C.**
- F.** Pipette **100 µL stop solution [STOP]** into each well (including blank) in the same sequence and at the same

speed as used for dispensing TMB substrate. **Shake for 1–2 min at room temperature.**

G. Read OD at 450 nm within 20 min.

Assay Protocol 2: (without shaking)

(see also Assay scheme to Assay Protocol 2, section 13.6)

All samples should be tested in duplicates.

A. Pipette 150 µL conjugate [CONJ] into each well except wells A1-A2 (blank);

B. Pipette 50 µL of calibrators [CAL], control [CONTROL] and patient's samples in duplicates, into the respective wells; except wells A1-A2.

Note: total time of dispensing must not exceed 15 minutes, otherwise the test result may be unreliable, because the time of incubation will substantially vary for different samples.

Note: If an adhesive foil is used, put it now onto the plate to seal the cavities.

C. Incubate for 90 minutes at +37 °C (pre-shake for 1-2 minutes at room temperature).

Note: If an adhesive foil is used, remove it now from the plate.

D. Wash 5 times, as described below.

E. Pipette 100 µL substrate [SUB] into each well (including blank); incubate strips at room temperature (+18...+25 °C) in the dark for 15-30 minutes depending on the colour intensity.

F. Pipette 100 µL stop solution [STOP] into each well (including blank) in the same sequence and at the same

speed as used for dispensing TMB substrate. **Shake for 1–2 min at room temperature.**

G. Read OD at 450 nm within 20 min.

13.3.1. Wash Procedure

It is advisable to use an automatic microplate washer set at 5 wash cycles and a volume of 300 μ L of wash solution per well per cycle.

If an automatic washer is not available, the wash procedure can be carried out manually as follows:

- remove the contents of the wells into a container with disinfectant;
- dispense 300 μ L of wash solution (section 8) into each well, shake the plate carefully for 5–10 sec and remove the contents of the wells; repeat 5 times;
- strike the wells sharply on absorbent material to remove any liquid residue.

13.4. Data Processing

If the reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in wells A1-A2, subtract mean OD value of wells A1-A2 from all OD values before further calculations.

Example:

OD (Cal 5) measured = 2.28 and OD (blank) = 0.06;

OD (Cal 5) calculated = $2.28 - 0.06 = \underline{2.22}$

13.4.1. Data Reliability (OD measured at 450 nm)

The data should meet the following criteria:

- average blank OD (in wells A1-A2) ≤ 0.100 ;

- average OD of Cal 5 ≥ 1.5 (after blank subtraction);
- control's concentration must fall within the acceptability range that is shown on the Quality Control Sheet.

If the data obtained do not meet the criteria, the results are considered unreliable and the test should be repeated.

13.4.2. Quantitative Determination

Specialized software for quantitative determination is recommended. Mean OD values of the calibrators at 450 nm versus their respective hCG concentrations using **4PL** or **5PL fit** (Fig. 2 Typical standard curve). Calculate concentration of hCG in samples using standard curve.

Any extrapolation of the standard curve to hCG concentration above the nominal value of calibrator 5 is forbidden. In this case the sample should be diluted 20-, 400- or 2 000-fold with sample diluent and re-tested. Multiply the measured concentration of pre-diluted samples by corresponding dilution factor.

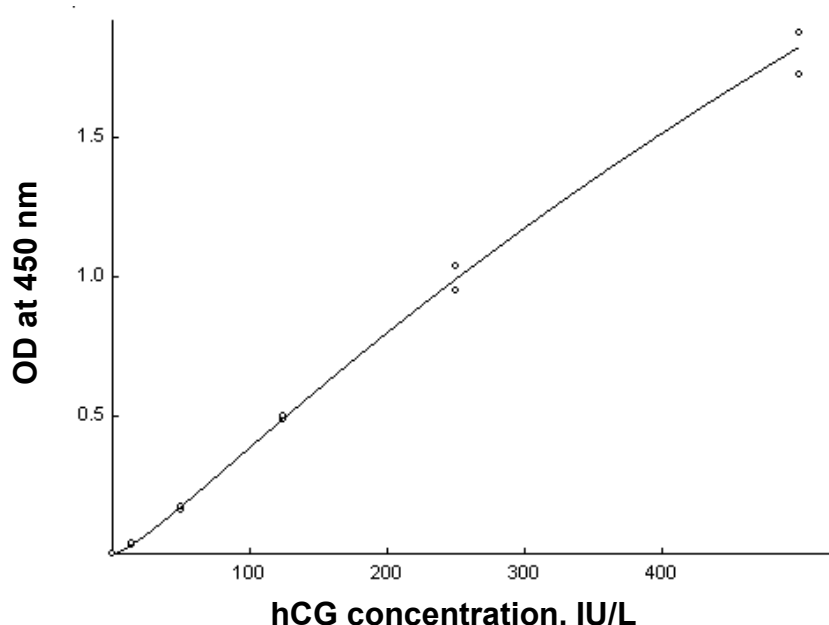


Fig. 2 Example of typical standard curve

Do not use for evaluation of real assay data!
13.5 Assay scheme to Assay Protocol 1

Wells	«Blank»	CAL CONTROL	Samples
Reagents			
CONJ	–	150 µL	150 µL
CAL CONTROL	–	50 µL	–
Samples	–	–	50 µL
Incubation No.1	60 min, +37 °C, 500–800 rpm		
WASH P (diluted)	5 x 300 µL		
SUB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubation No.2	15–30 min, +18...+25 °C, in the dark		
	10 min, +37 °C, 500–800 rpm		
STOP	100 µL	100 µL	100 µL
Stirring	1–2 min, +18...+25 °C		
OD measuring	450 nm		
Calculations	Corresponding software		

13.6 Assay scheme 2

Reagents \ Wells	«Blank»	CAL CONTROL	Samples
CONJ	–	150 µL	150 µL
CAL CONTROL	–	50 µL	–
Samples	–	–	50 µL
Incubation No.1	90 min, +37 °C (pre-shake for 1-2 minutes at room temperature)		
WASH P (diluted)	5 x 300 µL		
SUB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubation No.2	15–30 min, +18...+25 °C, in the dark		
STOP	100 µL	100 µL	100 µL
Stirring	1–2 min, +18...+25 °C		
OD measuring	450 nm		
Calculations	Corresponding software		

14. AUTOMATIC TEST (REF 22-01 A)

14.1. Material Provided

MP	Microplate: 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-hCG monoclonal antibodies	1 pcs
CONJ	Conjugate: solution contains anti-hCG monoclonal antibodies conjugated with HRP	18 mL, ready to use
0-5 CAL	hCG calibrators: protein-sebased solution or lyophilized preparations containing known hCG concentrations – 0; 15; 50; 125; 250; 500 IU/L (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). For lot specific hCG concentrations see values provided in the Quality Control Sheet.	6 vials, 0.5 mL each; ready to use or lyophilized
CONTROL	hCG control: protein-based solution or lyophilized preparation containing known hCG concentration. For lot specific ranges of hCG concentrations see Quality Control Sheet	0.5 mL, ready to use or lyophilized
WASH P 20X	Wash solution P, 20X concentrated: surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 1000 mL of solution	50 mL, concentrated
SUB	Substrate (TMB solution): 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
STOP	Stop solution: 1 N HCl solution	19 mL, ready to use
TRIAL 5000X	Trial solution, 5000X concentrated: solution of detergent	It is delivered by separate order
DIL	Sample diluent: protein-based solution	2 × 50 mL, ready to use

Note: *Extra vials of **CAL** 2, 3 and **CONTROL** are provided for recalibration on reference calibration curve. For detailed information see instructions for use for analyser “Alisei”.*

14.2. Equipment and Materials Required but not provided

- Automatic analyser for ELISA kits on microplate (analyser “Alisei”);
- Multipurpose polypropylene tubes 12x75 volume 5.5 mL;
- **TRIAL 5000X** Trial solution, 5000X concentrated*;
- Deionized or distilled water;
- Latex or plastic gloves.

14.3. Test Procedure

Gonadotropin hCG kit is designed for 96 tests. This is sufficient for 88 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in monoplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

14.3.1. Reagent Preparation

Allow all the reagents to reach room temperature (+18...+25 °C), and then thoroughly stir.

Note: Preparation of other reagents see in section 8.

TRIAL Working solution of Trial for washing internal hydraulic lines and needles of automatic analyser “Alisei”
Prepare required volume of **Trial solution** by dilution of the concentrate 5000-fold with distilled or deionized water before analysis: 2 mL **TRIAL 5000X** + 9998 mL water

* Reagent is not included in the kit, it is delivered by separate order.

Mix thoroughly, avoid foaming.

14.3.2. Assay Procedure for Automatic Test

While using for the procedure analyser “Alisei”, refer to its relative manual.

The analysis on ELISA analyser “Alisei” is completely automatic: pipetting of reagents, washing, incubation, OD measurement, analysis of results. The program of calculation hCG concentration is hardwired in analyser memory.

14.4. Data Processing

14.4.1. Data Reliability (OD measured at 450 nm)

See criteria in section 13.4.1.

14.5. Safety precautions

- If kit for analyser “Alisei” is used in several separate experiments it is necessary to take reagents from analyser “Alisei” immediately after pipetting them in the wells of all plates because liquid evaporates from vials. Put the reagents in refrigerator:
- Recalibration using calibration curve, obtained with a kit of any other lot, is not permitted.

August 26, 2019



Astra Biotech GmbH
Rudower Chaussee 29,
12489 Berlin, Germany
Telefon: +49 (0)30 74696509
E-Mail: info@astrabiotech.de
www.astrabiotech.de