



Free β hCG-IRMA

KIP1001

Read entire protocol before use.

Free β hCG-IRMA

I. INTENDED USE

Immunoradiometric assay kit for the *in vitro* quantitative measurement of Free β human Chorionic Gonadotropin (β hCG) in serum.

This kit is not intended to be used for the risk evaluation of trisomy 21.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource Free β hCG -IRMA Kit
- B. **Catalog number :** KIP1001: 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological activities

The chorionic gonadotropic hormone is synthesised by the syncytiotrophoblast of the placenta all along the pregnancy and is released in the blood flow as soon as the 9th day following ovulation.

The hCG has biologic characteristics similar to the LH. During pregnancy, this placental hormone stimulates the remaining corpus luteum that secretes oestrogen and progesterone for the first three months of the pregnancy. The hCG also stimulates developing placental elements which secrete the various steroid hormones, while the function of corpus luteum decreases, the level of oestrogen and of progesterone continues to increase as the placenta matures. In addition to that stimulating action on the luteal and placental tissue, the hCG by crossing the placenta is essential to differentiate the genital tract of the foetus, which occurs around the 7th week of the pregnancy. The foetal hypophysis does not secrete gonadotropins until later stages of maturation.

The hCG has also specific characteristics of FSH and TSH that is why most of the authors regard the hCG as the "ancestral" placental glycoprotein hormone having at the same time the three biologic hypophyseal hormones. The hCG of 37,900 Daltons comprises of two subunits, α and β bound in a non covalent way, as FSH, LH, TSH hormones. The hCG α -subunit of 14,900 Daltons is similar to the α -subunits constituting the hypophyseal hormones. The β -subunits specific to every glycoprotein hormone and gives their specific biologic activity. The chemical structures differ from one glycoprotein hormone to another, but for the β -subunits there is an antigenic continuity from one type to another. The hCG β -subunit is very similar to the LH β -subunit.

B. Clinical application

1. Diagnostic and monitoring test in pregnancy
hCG and its free subunits α and β appear in the serum and urine of pregnant women about 9 days following ovulation. The Free β hCG level then increases rapidly to reach a peak between the 8th and the 12th week.
2. Tumour marker test in trophoblastic tumours
Hydatiform moles and choriocarcinomas may secrete large amounts of native hCG and its two free subunits α and β into the peripheral blood circulation.
3. Tumour marker test in non-trophoblastic cancers
10 to 15 % of the breast, lung, and digestive tract cancers release hCG and/or either of its two constitutive subunits α and β .

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

A. Key feature

The Free β hCG IRMA has been developed in order to provide medical laboratories with an assay characterized by two dominant features :

- A 100 % recognition with free β chain to guarantee detection of ectopic tumour secreting predominantly free β chain rather than native hCG.
- A pregnancy test that provides a precise quantitative measurement of β hCG Free level in serum when using 1 hour incubation protocol without cross reaction with dimeric hCG.

B. Principle of the test

The DIASource β hCG-IRMA is an immunoradiometric assay based on coated tube separation. Mabs1, the capture antibodies, are attached to the lower and inner surface of the plastic tube. Calibrators or samples added to the tubes will at first show low affinity for Mabs1. Addition of Mab2, the signal antibody labelled with ^{125}I , will complete the system and trigger the immunological reaction. After washing, the remaining radioactivity bound to the tube reflects the antigen concentration. The use of several distinct Mabs avoids hyperspecificity.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	Quantity 96 tests	Colour Code	Reconstitution			
 Tubes coated with anti β hCG (monoclonal antibodies)	2 x 48	black	Ready for use			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> Anti- β hCG - ¹²⁵ I (monoclonal antibodies) in Phosphate Buffer with bovine serum albumin, sodium azide (< 0.1 %) and inert red dye	Ab	¹²⁵ I	1 vial 22 ml 750 kBq	red	Ready for use	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Zero Calibrator in human serum with thymol	CAL	0	1 vial lyophil.	yellow	Add 0.5 ml distilled water	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrators 1-7 in human serum with thymol (see exact values on vial labels)	CAL	N	7 vials lyophil.	yellow	Add 0.5 ml distilled water	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>DIL</td><td>SPE</td></tr></table> Specimen diluent: Phosphate buffer with bovine serum albumin and azide (< 0.1%)	DIL	SPE	1 vial 22 ml	black	Ready for use	
DIL	SPE					
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Incubation Buffer: Phosphate buffer with bovine serum albumin and azide (< 0.1%)	INC	BUF	1 vial 22 ml	black	Ready for use	
INC	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wash solution (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	2 vials 10 ml	brown	Dilute 70 x in distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controls 1 and 2 in human serum with thymol	CONTROL	N	2 vials lyophil.	silver	Add 0.5 ml distilled water	
CONTROL	N					

Note: 1. Use the specimen diluent for sera dilutions.
2. 1 mIU of the calibrator preparation is equivalent to 1 mIU of the 3rd IRP 75/551.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 50 μl , 200 μl , 500 μl and 1 ml. (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer

5. Tube shaker (600 rpm)
6. 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
7. Aspiration system (optional).
8. Any gamma counter capable of measuring ^{125}I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- A. Calibrators: Reconstitute the calibrators with 0.5 ml distilled water..
- B. Controls: Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- C. Working Wash solution: Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kit components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution, calibrators and controls are stable for 7 days at 2-8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for 3 months. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- § Serum must be kept at 2 – 8°C.
- § If the test is not run within 24 hours, storage at -20°C is recommended.
- § Avoid subsequent freeze-thaw cycles.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date. Do not mix materials from different kit lots. Bring all the reagents to room temperature prior to use. Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision. Respect the incubation times. Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

B. Procedure

1. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample. For determination of total counts, label 2 normal tubes.
2. Briefly vortex calibrators, samples and controls and dispense 50 μl of each into the respective tubes.
3. Dispense 200 μl of Incubation Buffer into each tube except total counts.
4. Incubate for 30 min at room temperature with continuous shaking (600 rpm).
5. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
6. Wash the tubes twice with 3 ml Wash Solution (except total counts). Avoid foaming during the addition of the Working Wash Solution.
7. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts).
8. After the last washing, let the tubes standing upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
9. Dispense 200 μl of anti- β hCG- ^{125}I tracer into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
10. Shake the rack containing the tubes gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
11. Incubate for 30 min at room temperature with continuous shaking (600 rpm).
12. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
13. Wash the tubes twice with 3 ml Wash Solution (except total counts). Avoid foaming during the addition of the Working Wash Solution.
14. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts).
15. After the last washing, let the tubes standing upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
16. Count the tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

- 1. Calculate the mean of duplicate determinations.
- 2. On semi-logarithmic or linear graph paper plot the c.p.m. (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of β hCG (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points, reject the obvious outliers.
- 3. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
- 4. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

β hCG-IRMA		cpm	B/T (%)
Total count		230469	100
Calibrator	0 mIU/ml	299	0.1
	0.29 mIU/ml	1196	0.5
	0.96 mIU/ml	3084	1.3
	2.8 mIU/ml	8790	3.8
	8.8 mIU/ml	25501	11.1
	28 mIU/ml	68274	29.6
	56 mIU/ml	108661	47.1
	93 mIU/ml	146141	63.4

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

- A. Detection Limit**
Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations above the average counts at zero binding, was 0.03 mIU/ml.
- B. Specificity**
Cross-reactive hormones were added to a low and to a high β hCG value calibrator. The apparent β hCG response was measured.

added Hormone	β hCG CAL 1 mIU/ml	β hCG CAL 6 mIU/ml
-	0.29	56
FSH 300 mIU/ml	0.28	58
TSH 300 μ IU/ml	0.25	58
LH 300 mIU/ml	0.31	60
β LH 10000 ng/ml	46.8	86
α hCG 500 ng/ml	0.8	55

C. Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> $\pm$ S.D. (mIU/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> $\pm$ S.D. (mIU/ml)	CV (%)
A	10	1.42 $\pm$ 0.10	7.3	C	20	1.32 $\pm$ 0.08	5.8
B	10	10.7 $\pm$ 0.3	2.5	D	20	8.9 $\pm$ 0.3	3.6

D. Accuracy

RECOVERY TEST			
Sample	Added β hCG (mIU/ml)	Recovered β hCG (mIU/ml)	Recovery (%)
A	0.44	0.38	87.2
	0.81	0.79	97.9
	3.66	3.88	106.0
	19.5	19.0	97.4
	37.3	36.7	98.4

DILUTION TEST			
Sample	Dilution	Theoretical Concent. (mIU/ml)	Measured Concent. (mIU/ml)
1	1/1	-	7.73
	1/2	3.87	4.21
	1/5	1.55	1.31
	1/10	0.77	0.76
	1/20	0.39	0.43
2	1/1	-	30.62
	1/2	15.31	15.29
	1/5	6.12	6.13
	1/10	3.06	2.88
	1/20	1.53	1.51

Samples were diluted with specimen diluent.

- E. Time Delay**
As shown below, assay results remain accurate even when a sample is dispensed up to 30 minutes after the calibrator has been added to the coated tubes.

TIME DELAY				
	0' (mIU/ml)	10' (mIU/ml)	20' (mIU/ml)	30' (mIU/ml)
Serum 1	1.33	1.35	1.34	1.35
Serum 2	10.27	9.96	10.56	10.49

- F. Hook effect**
A serum sample with a concentration of 12800 mIU/ml β hCG gives a signal above the highest calibrator concentration.

XIV. LIMITATIONS

- Specimens from patients who have received preparations of mouse monoclonal antibodies for diagnosis or therapy may contain human anti-mouse antibodies (HAMA). Such specimens may show either falsely elevated or depressed values when tested with assay kits which employ mouse monoclonal antibodies.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with in vitro immunoassays. Patients routinely exposed to animals or animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed in case of the presence of heterophelic antibodies. Carefully evaluate the results of patients suspected of having these antibodies. If results are not consistent with other clinical observations, additional information should be required before diagnosis.

XV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises

XVI. REFERENCE INTERVALS

The values provided below are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

Identification	Number of subjects	Values (mIU/ml)
Normal subjects	33	< 0.1 mIU/ml

XVII. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.
This kit contains ¹²⁵I (half-life: 60 days) ,emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.
This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.
All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.
Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.
The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.
All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.
Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.
Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

XVIII. BIBLIOGRAPHY

1.

CHEN F. et al., (1987)

Radioimmunoassay of the serum free β-subunit of human chorionic gonadotropin in trophoblastic disease.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 64:313.

2.

DAWOOD M.Y. et al., (1977)

Human chorionic gonadotropin and its subunit in hydatidiform mole and choriocarcinoma.

Obstet. Gynecol., 50:172.

3.

GASPARD V.J. et al., (1980)

Serum concentration of human chorionic gonadotropin and its alpha and beta subunit in Trophoblastic tumours.

Clin. Endocrinol. (Oxf.), 13:219.

4.

PIERCE J.G. et al., (1981)

Glycoprotein hormones : structure and function.

Annu. Rev. Biochem., 50:465.

5.

KARDANO A. et al., (1994)

Human Chorionic Gonadotropin β-Subunit Nicking enzymes in Pregnancy and Cancer Patient Serum.

J. Clin. Endocr. Metab., 79:761-767.

XIX. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS ml	CALIBRATORS ml	SAMPLE(S) CONTROLS ml
Calibrators (0-7) Samples / Controls Incubation Buffer	- 0.2	0.05 - 0.2	- 0.05 0.2
Incubation	30 minutes at room temperature with continuous shaking		
Separation Washing solution Separation Washing solution Separation	- - - - -	aspirate (or decant) 3.0 aspirate (or decant) 3.0 aspirate (or decant)	
Tracer	0.2	0.2	0.2
Incubation	30 minutes at room temperature with continuous shaking		
Separation Washing solution Separation Washing solution Separation	- - - - -	aspirate (or decant) 3.0 aspirate (or decant) 3.0 aspirate (or decant)	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

DIAsource Catalogue Nr : KIP1001	P.I. Number : 1700545/en	Date of issue : 101021/1
-------------------------------------	-----------------------------	-----------------------------

Revision date : 2010-10-21

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

Free β hCG-IRMA

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunologique pour la mesure quantitative *in vitro* de la Gonadotropine Chorionique humaine β libre (β hCG) dans le sérum humain.

Cette trousse n'est pas destinée à être utilisée pour évaluer le risque de trisomie 21.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource Free β hCG -IRMA kit
- B. **Numéro de catalogue :** KIP1001 : 96 Tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8 B-1400 Nivelles Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. Activités biologiques

L'hormone gonadotrophique chorionique est synthétisée par le syncytiotrophoblaste du placenta pendant toute la grossesse et est libérée dans la circulation sanguine à partir du 9^{ième} jour après l'ovulation.

La hCG a des caractéristiques similaires à celles de la LH. Pendant la grossesse, cette hormone placentaire stimule le corps jaune restant qui sécrète des œstrogènes et de la progestérone pendant les trois premiers mois de la grossesse. La hCG stimule également des éléments placentaires qui sécrètent les diverses hormones stéroïdes. Tandis que la fonction du corps jaune diminue, le taux en œstrogène et en progestérone continue d'augmenter lors du développement du placenta. En plus de cette action stimulante sur le tissu lutéal et placentaire, La hCG, en traversant le placenta, est essentielle pour différencier le tractus génital du fœtus, qui apparaît vers la 7^{ième} semaine de la grossesse. L'hypophyse fœtale ne sécrète pas de gonadotropines jusqu'à des phases ultérieures de la maturation.

La hCG a aussi des caractéristiques spécifiques de la FSH et de la TSH. Voilà pourquoi la plupart des auteurs considèrent la hCG comme l'hormone glycoprotéique placentaire « ancestrale », ayant en même temps les trois hormones hypophysaires biologiques. La hCG de 37 900 Daltons comprend deux sous-unités α et β liées de façon non covalente, comme les hormones FSH, LH, TSH. La sous-unité hCG α de 14 900 Daltons est similaire aux sous-unités α qui constituent les hormones hypophysaires. Les sous-unités β sont spécifiques pour chaque hormone glycoprotéique ce qui donne leur activité biologique spécifique. Les structures chimiques diffèrent d'une hormone glycoprotéique à une autre, mais pour les sous-unités β il y a une continuité antigénique entre les différents types. La sous-unité hCG β est très similaire à la sous-unité LH β .

B. Applications cliniques

1. Test d'évaluation et test diagnostique pour la grossesse
La hCG et ses sous-unités libres α et β apparaissent dans le sérum et l'urine de femmes enceintes après environ 9 jours après l'ovulation. Puis, le taux en hCG β libre augmente rapidement pour atteindre un sommet entre la 8^{ième} et la 12^{ième} semaine.
2. Test de marqueur de tumeur pour des tumeurs trophoblastiques
Des mûles hydatiformes et des choriocarcinomes peuvent sécréter de grandes quantités de hCG native et de ses deux sous-unités libres α et β dans la circulation sanguine périphérique.
3. Test de marqueur de tumeur pour des cancers non-trophoblastiques
10 à 15 % des cancers du sein, du poumon et de l'intestin sécrètent de la hCG et/ou ses deux sous-unités constitutives α et β .

IV. PRINCIPES DU DOSAGE

A. Caractéristique principale

La βhCG libre-IRMA a été développée pour offrir aux laboratoires médicaux un test caractérisé par deux caractéristiques dominantes :

- Une reconnaissance de 100 % avec la chaîne β libre pour garantir la détection de la tumeur ectopique sécrétant des chaînes β libres plutôt que de la hCG native.
- Un test de grossesse qui offre une mesure quantitative précise du taux en βhCG libre dans le sérum si un protocole d’incubation de 1 heure est utilisé sans réaction croisée avec la hCG dimère.

B. Principe du test

La trousse DIAsource βhCG-IRMA est une trousse de dosage radio-immunologique basée sur la séparation en tube recouvert d'anticorps. Mabs1, les anticorps de capture, sont attachés sur la surface basse et interne du tube plastic. Les calibrateurs ou les échantillons ajoutés dans les tubes présenteront dans un premier temps une faible affinité pour Mabs1. L’addition de Mab2, l’anticorps signal marqué avec I¹²⁵, complètera le système et déclenchera la réaction immunologique. Suite au lavage, la radioactivité restante liée au tube reflètera la concentration de l’antigène. L’utilisation de plusieurs Mabs différents évite l’hypermé spécificité.

V. REACTIFS FOURNIS

Reactifs	96 tests Kit	Code Couleur	Reconstitution			
 Tubes recouverts avec l'anti βhCH (anticorps monoclonal)	2 x 48	Rouge	Prêt à l'emploi			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRACEUR: anti – βhCH marquée à l' ¹²⁵ Iodine (anticorps monoclonaux) dans un tampon phosphate avec de l'albumine bovine, de l'azide de sodium (<0,1%) et un colorant rouge inactif	Ab	¹²⁵ I	1 flacon 22 ml 750 kBq	Rouge	Prêt à l'emploi	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrateur zéro dans du sérum humain et du thymol	CAL	0	1 flacon lyophilisé	Jaune	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrateur N = 1 à 7 (cfr. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans du sérum humain et du thymol	CAL	N	7 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>DIL</td><td>SPE</td></tr></table> Diluant de Spécimen: Tampon phosphate avec de l'albumine bovine et de l'azide de sodium (<0,1%)	DIL	SPE	1 flacon 22 ml	noir	Prêt à l'emploi	
DIL	SPE					
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Tampon d'Incubation: Tampon phosphate avec de l'albumine bovine et de l'azide de sodium (<0,1%)	INC	BUF	1 flacon 22 ml	noir	Prêt à l'emploi	
INC	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solution de Lavage (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	Brun	Diluer 70 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Contrôles - N = 1 ou 2 dans du sérum humain avec du thymol	CONTROL	N	2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée	
CONTROL	N					

Note:

1. Utiliser le Diluant de Spécimen pour la dilution des échantillons.
2. 1 mIU de la préparation du calibrateur est équivalent à 1 mIU de 3rd IRP 75/551.

VI. MATERIELS NON FOURNIS

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

1. Eau distillée
2. Pipettes pour distribuer: 50 µl, 200 µl, 500 µl et 1 ml (l’utilisation de pipettes précises et de pointes en plastique est recommandée)
3. Agitateur vortex
4. Agitateur magnétique
5. Agitateur de tubes
6. Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
7. Système d’aspiration (optionnel)
8. Tout compteur gamma capable de mesurer I¹²⁵I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. **Calibrateurs** : Reconstituer les calibrateurs avec 0,5 ml d’eau distillée.
- B. **Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d’eau distillée.
- C. **Solution de Lavage** : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d’eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D’EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l’ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu’à la date d’expiration, indiquée sur l’étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables pendant 7 jours entre 2 et 8 °C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquots devront être réalisés et ceux-ci seront gardés à –20°C, pendant 3 mois. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu’à la date d’expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d’origine correctement fermé.
- Des altérations dans l’apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L’ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n’est pas réalisé dans les 24 heures, un stockage à –20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.

X. MODE OPERATOIRE

A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d’expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation. Mélangez tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l’addition de chaque réactif et échantillon. Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d’augmenter la précision. Respecter les temps d’incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d’expériences, ne pas utiliser les données d’expériences précédentes.

B. Mode opératoire

1. Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse, en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l’activité totale, identifier 2 tubes non recouverts d’ anticorps.
2. Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les contrôles et les échantillons. Puis distribuer 50 µl de chacun d’eux dans leurs tubes respectifs.
3. Distribuer 200 µl de tampon d’incubation dans chaque tube.
4. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation continue (600 rpm).
5. Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l’exception des tubes utilisés pour la détermination de l’activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d’eux pour éliminer toute trace de liquide.

6. Laver les tubes avec 3 ml de Solution de Lavage (à l’exception des tubes utilisés pour la détermination de l’activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l’addition de la Solution de Lavage.
7. Aspirer (ou décanner) le contenu de chaque tube (à l’exception des tubes utilisés pour la détermination de l’activité totale).
8. Laver les tubes à nouveau avec 3 ml de Solution de Lavage (à l’exception des tubes utilisés pour la détermination de l’activité totale) et aspirer (ou décanner).
9. Après le dernier lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer (ou décanner) le reste de liquide.
10. Distribuer 200 µl de traceur dans chaque tube.
11. Agiter légèrement le portoir de tube manuellement pour libérer toute bulle d’air emprisonnée.
12. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation continue (600 rpm).
13. Aspirer (ou décanner) le contenu de chaque tube (à l’exception des tubes utilisés pour la détermination de l’activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d’eux pour éliminer toute trace de liquide.
14. Laver les tubes avec 3 ml de Solution de Lavage (à l’exception des tubes utilisés pour la détermination de l’activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l’addition de la Solution de Lavage.
15. Aspirer (ou décanner) le contenu de chaque tube (à l’exception des tubes utilisés pour la détermination de l’activité totale).
16. Laver les tubes à nouveau avec 3 ml de Solution de Lavage (à l’exception des tubes utilisés pour la détermination de l’activité totale) et aspirer (ou décanner).
17. Après le dernier lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer (ou décanner) le reste de liquide.
18. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

1. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
2. Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les cpm (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en βhCG (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l’aide des points de calibration, écarter les valeurs aberrantes.
3. Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.
4. L’analyse informatique des données simplifiera les calculs. Si un système d’analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d’ utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.

XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont fournies pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d’une courbe de calibration.

βhCG-IRMA		cpm	B/T (%)
Activité totale		230469	100
Calibrateur	0 mIU/ml	299	0,1
	0,29 mIU/ml	1196	0,5
	0,96 mIU/ml	3084	1,3
	2,8 mIU/ml	8790	3,8
	8,8 mIU/ml	25501	11,1
	28 mIU/ml	68274	29,6
	56 mIU/ml	108661	47,1
	93 mIU/ml	146141	63,4

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES

- A. **Sensibilité**
Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d’autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 0,03 mIU/ml.
- B. **Spécificité**
Des hormones cross-réactives ont été ajoutées à un calibrateur à valeur βhCG basse et à un calibrateur à valeur βhCG haute. La réponse βhCG apparente a été mesurée.

Hormone ajoutée	βhCG CAL 1 mIU/ml	βhCG CAL 6 mIU/ml
-	0,29	56
FSH 300 mIU/ml	0,28	58
TSH 300 µIU/ml	0,25	58
LH 300 mIU/ml	0,31	60
βLH 10000 ng/ml	46,8	86
ahCG 500 ng/ml	0,8	55

C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	<X> ± SD (mIU/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (mIU/ml)	CV (%)
A	10	1,42 ± 0,10	7,3	C	20	1,32 ± 0,08	5,8
B	10	10,7 ± 0,3	2,5	D	20	8,9 ± 0,3	3,6

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE RECUPERATION			
Echantillon	βhCG ajoutée (mIU/ml)	βhCG récupérée (mIU/ml)	Récupération (%)
A	0,44	0,38	87,2
	0,81	0,79	97,9
	3,66	3,88	106,0
	19,5	19,0	97,4
	37,3	36,7	98,4

TEST DE DILUTION			
Echantillon	Dilution	Concent. théorique (mIU/ml)	Concent. Mesurée (mIU/ml)
1	1/1	-	7,73
	1/2	3,87	4,21
	1/5	1,55	1,31
	1/10	0,77	0,76
	1/20	0,39	0,43
2	1/1	-	30,62
	1/2	15,31	15,29
	1/5	6,12	6,13
	1/10	3,06	2,88
	1/20	1,53	1,51

Les échantillons ont été dilués avec le Diluant de Spécimen.

- E. **Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l’échantillon**
Comme montré ci-dessous, les résultats d’un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 30 minutes après que le calibrateur a été ajouté aux tubes avec l’anticorps.

DELAI				
	0' (mIU/ml)	10' (mIU/ml)	20' (mIU/ml)	30' (mIU/ml)
Serum 1	1,33	1,35	1,34	1,35
Serum 2	10,27	9,96	10,56	10,49

- F. **Effet crochet**
Un échantillon dopé avec du βhCG jusqu’à 12800 mIU/ml donne des cpm supérieurs au dernier point de calibration.

XIV. LIMITATIONS

- Les échantillons de patients ayant reçu des préparations d'anticorps monoclonaux de souris pour un diagnostic ou comme traitement peuvent contenir des anticorps humains anti-souris (HAMA). De tels échantillons peuvent montrer des valeurs soit faussement élevées soit faussement basses lorsqu'ils sont analysés avec des trousse d'analyses utilisant des anticorps monoclonaux de souris.
- Des anticorps hétérophiles dans le sérum humain peuvent réagir avec le réactif immunoglobulines, interférant ainsi avec les méthodes d'analyse immunologiques in vitro.
Les patients couramment en contact avec des animaux ou des produits de sérum animal peuvent être sujets à ces interférences. Des valeurs anormales peuvent être observées en cas de présence d'anticorps hétérophiles. Évaluer soigneusement les résultats des patients suspectés d'avoir ces anticorps.
Si les résultats ne sont pas cohérents avec les autres observations cliniques, des informations supplémentaires doivent être demandées avant de poser le diagnostic.

XV. CONTROLE DE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs in duplo des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XVI. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont données à titre d'information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.

Identification	Nombre de sujets	Moyenne (mIU/ml)
Sujets normaux	33	< 0,1 mIU/ml

XVII. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité
Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.
Cette trousse contient de l'¹²⁵I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35.5 keV). Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux. Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.
Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate. Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.
L'azide de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azide de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azide dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVIII. BIBLIOGRAPHIE

1.

CHEN F. et al., (1987)
Radioimmunoassay of the serum free β-subunit of human chorionic gonadotropin in trophoblastic disease.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 64:313.

2.

DAWOOD M.Y. et al., (1977)
Human chorionic gonadotropin and its subunit in hydatidiform mole and choriocarcinoma.
Obstet. Gynecol., 50:172.

3.

GASPARD V.J. et al., (1980)
Serum concentration of human chorionic gonadotropin and its alpha and beta subunit in Trophoblastic tumours.
Clin. Endocrinol. (Oxf.), 13:219.

4.

PIERCE J.G. et al., (1981)
Glycoprotein hormones : structure and function.
Annu. Rev. Biochem., 50:465.

5.

KARDANO A. et al., (1994)
Human Chorionic Gonadotropin β-Subunit Nicking enzymes in Pregnancy and Cancer Patient Serum.
J. Clin. Endocr. Metab., 79:761-767.

XIX. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTALE (ml)	CALIBRA- TEURS (ml)	ECHANTIL- LON(S) CONTROLES (ml)
Calibrateurs (0-7) Echantillons, Contrôles Tampon d'Incubation	- 0,2	0,05 - 0,2	- 0,05 0,2
Incubation	30 minutes à température ambiante sous agitation continue		
Séparation Solution de Lavage Séparation Solution de Lavage Séparation	- - - - -	Aspiration 3,0 Aspiration 3,0 Aspiration	
Traceur	0,2	0,2	0,2
Incubation	30 minutes à température ambiante sous agitation continue		
Séparation Solution de Lavage Séparation Solution de Lavage Séparation	- - - - -	Aspiration 3,0 Aspiration 3,0 Aspiration	
Comptage	Temps de comptage des tubes: 60 secondes		

DIAsource Catalogue Nr : KIP1001	P.I. Number : 1700545/fr	Revision nr : 101021/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Lees het hele protocol vóór gebruik.

Free β hCG-IRMA

I. BEOOGD GEBRUIK

Immunoradiometrische testkit voor de *in vitro* kwantitatieve bepaling van humaan Vrij β Chorionisch Gonadotrofine (β hCG) in serum.

Deze testkit mag niet worden gebruikt bij de evaluatie van het risico op trisomie 21.

II. ALGEMENE INFORMATIE

A. **Gedeponeerd handelsmerk:** DIAsource Free β hCG -IRMA kit

B. **Catalogusnummer:** KIP1001 : 96 testen

C. **Geproduceerd door:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8 B-1400 Nivelles, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie kunt u contact opnemen met:

Tel.: +32 (0)67 88 99 99 - Fax: +32 (0)67 88 99 96

III. KLINISCHE ACHTERGROND

A. Biologische activiteiten

Het chorionisch gonadotroop hormoon wordt gesynthetiseerd door de syncytiotrophoblast van de placenta de hele zwangerschap lang en wordt al vrijgegeven in de bloedsomloop van de 9e dag na de ovulatie.

hCG heeft biologische eigenschappen gelijkaardig aan die van LH. Gedurende de zwangerschap stimuleert dit placentale hormoon het overgebleven corpus luteum dat oestrogeen en progesteron afscheidt tijdens de eerste drie maanden van de zwangerschap. hCG stimuleert ook de ontwikkeling van placentale elementen die de verschillende steroïde hormonen afscheiden. Terwijl de functie van het corpus luteum afneemt, blijft het gehalte aan oestrogeen en progesteron stijgen terwijl de placenta rijpt. Naast die stimulerende werking op het luteale en placentale weefsel is hCG, door het kruisen van de placenta, essentieel om de genitale tractus van de foetus te differentiëren, wat voorkomt rond de 7e week van de zwangerschap. De foetale hypofyse scheidt geen gonadotrofines af tot latere fases van rijping.

hCG heeft ook specifieke kenmerken van FSH en TSH, en dat is waarom de meeste auteurs hCG beschouwen als het "ancestrale" placentale glycoproteïne, dat tegelijkertijd de drie biologische hypofysale hormonen heeft. hCG van 37,900 Daltons bevat twee subunits, α en β die gebonden zijn op een niet covalente manier, zoals de hormonen FSH, LH, en TSH. De hCG α -subunit van 14,900 Daltons is gelijkaardig aan de α -subunits die de hypofysale hormonen uitmaken. De β -subunits zijn specifiek voor elk glycoproteïne hormoon en geeft hen hun specifieke biologische activiteit. De chemische structuren verschillen van één glycoproteïne hormoon tot een ander, maar wat betreft de β -subunits is er een antagonistische continuïteit van één type tot een ander. De hCG β -subunit is zeer gelijkaardig aan de LH β -subunit.

B. Klinische toepassingen

1. Diagnostische en observerende test bij zwangerschap

hCG en zijn vrije subunits α en β komen voor in het serum en de urine van zwangere vrouwen ongeveer 9 dagen na de ovulatie. Het vrije β hCG gehalte verhoogt dan snel om een piek te bereiken tussen de 8ste en de 12e week.

2. Tumor marker test bij trofoblast tumoren

Hydatiforme moedervlekken en choriocarcinoom kunnen grote hoeveelheden natief hCG en zijn twee vrije subunits α en β in de perifere bloedcirculatie afscheiden.

3. Tumor marker test bij non-trofoblast kankers

10 tot 15 % van de borst-, long-, en darmkankers geven hCG en/of zijn twee constitutieve subunits α en β af.

IV. **BESCHRIJVING VAN DE METHODE**

A. **Hoofdeigenschap**

De Vrije βhCG-IRMA is ontwikkeld om de medische laboratoria te voorzien van een test gekenmerkt door twee dominante eigenschappen:

- Een herkenning van 100 % met de vrije β keten om de detectie te garanderen van een ectopische tumor die de predominante vrije β keten afscheid eerder dan het natieve hCG.
- Een zwangerschapstest die een precieze kwantitatieve meting van het Vrije βhCG gehalte garandeert als een incubatieprotocol van 1 uur gerespecteerd wordt zonder kruisreactie met dimeer hCG.

B. **Principe van de test**

Free βhCG-IRMA van DIAsource is een immunoradiometrische bepaling die gebaseerd is op een scheiding aan de hand van een gecoate buis. Mabs1, de invangantilichamen, zijn onderaan aan het binnenoppervlak van de plastic buis gehecht. Kalibrators of monsters die toegevoegd worden aan de buizen zullen aanvankelijk een lage affiniteit vertonen voor Mabs1. Toevoeging van Mab2, het signaalgenererend antilichaam dat gelabeld werd met ¹²⁵I, zal het systeem vervolledigen en de immunologische reactie tweewegbrengen. Na de wasfase geeft de overblijvende radioactiviteit, gebonden aan de buis, de antigeenconcentratie weer. Door het gebruik van meerdere verschillende Mabs wordt hyperspecifiteit vermeden, die gebruikelijk is voor IRMA met 2 Mabs.

V. **GELEVERDE REAGENTIA**

Reagentia	Kit met 96 testen	Kleur-code	Reconstitutie			
 buizen gecoat met anti-βhCH (monoklonale antilichamen)	2 x 48	zwart	Klaar voor gebruik			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRACER: Anti- βhCH (monoklonale antilichamen) gelabeld met ¹²⁵ jood in fosfaat buffer met bovien serumalbumine, azide (< 0,1%) een inerte rode kleurstof	Ab	¹²⁵ I	1 flacon 22 ml 750 kBq	rood	Klaar voor gebruik	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Nulkalibrator in humaan serum met thymol	CAL	0	1 flacon gevries- droogd	geel	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibrator - N = 1 tot 7 (raadpleeg de flaconetiketten voor de exacte waarden) in humaan serum met thymol	CAL	N	6 flacons, gevries- droogd	geel	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>DIL</td><td>SPE</td></tr></table> Specimenverdunner: Fosfaat buffer met bovien serumalbumine en azide (< 0,1%)	DIL	SPE	1 flacon 22 ml	zwart	Klaar voor gebruik	
DIL	SPE					
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Incubatiebuffer: Fosfaat buffer met bovien serumalbumine en azide (< 0,1%)	INC	BUF	1 flacon 22 ml	zwart	Klaar voor gebruik	
INC	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wasoplossing (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	bruin	70 x met gedestilleerd water verdunnen (gebruik een magnetische roerder).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controles - N = 1 of 2 in humaan serum met thymol.	CONTROL	N	2 flacons, gevries- droogd	zilver	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen	
CONTROL	N					

Opmerking:

1. Gebruik Specimenverdunner voor monsterverdunningen
2. 1 mIE van de kalibratorbereiding is gelijk aan 1 mIE van 3^{de} IRP 75/551.

VI. **NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN**

De volgende materialen zijn noodzakelijk maar worden niet meegeleverd met de kit:

1. Gedestilleerd water.
2. Pipetten voor een volume van 50 µl, 200 µl, 500 µl en 1 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).

3. Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase.
4. Afzuigsysteem (facultatief).
5. Vortexmenger.
6. Magnetische roerder.
7. Schudder voor de buisjes.
8. Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van ¹²⁵I (rendement van ten minste 70%).

VII. **BEREIDING VAN HET REAGENS**

- A. **Kalibrators:** Reconstitueer de kalibrators met 0,5 ml gedestilleerd water.
- B. **Controles:** Reconstitueer de controles met 0,5 ml gedestilleerd water.
- C. **Werk-wasoplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 69 eenheden gedestilleerd water toe te voegen aan 1 eenheid wasoplossing (70 x).
Gebruik een magnetische roerder voor de homogenisering. Op het eind van de dag moet de ongebruikte werk-wasoplossing afgevoerd worden.

VIII. **OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA**

- Vóór opening of reconstitutie zijn alle kitcomponenten houdbaar tot de vervaldatum, zoals vermeld op het etiket, indien zij bewaard werden bij 2 tot 8°C.
- Na reconstitutie zijn de kalibrators en de controles gedurende 7 dagen houdbaar bij 2 tot 8°C. Voor een langere bewaartermijn moeten aliquots gemaakt worden, die bij –20°C bewaard moeten worden voor maximaal 3 maanden. Vermijd opeenvolgende cycli van bevriezen en ontdooien.
- Een vers bereide werk-wasoplossing moet op dezelfde dag nog gebruikt worden.
- Na het eerste gebruik is de tracer houdbaar tot de vervaldatum, indien bewaard bij 2 tot 8°C in de oorspronkelijke, goed afgesloten flacon.
- Wijzigingen in het fysieke aspect van kitreagentia kunnen wijzen op instabiliteit of op een kwaliteitsvermindering.

IX. **MONSTERAFFNAME EN MONSTERBEREIDING**

- Serum moet bij 2 tot 8°C bewaard worden.
- Indien de bepaling niet binnen 24 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze bij –20°C te bewaren.
- Vermijd opeenvolgende cycli van bevriezen en ontdooien.

X. **PROCEDURE**

A. **Opmerkingen bij de procedure**

Gebruik de kit of de componenten niet langer dan de aangegeven vervaldatum. Materialen van kits van verschillende loten mogen niet gemengd worden. Laat alle reagentia op kamertemperatuur komen vóór gebruik.
Meng alle reagentia en monsters goed door ze voorzichtig te bewegen of door er voorzichtig mee te draaien. Om kruisbesmetting te vermijden, moet een propere wegwerpbare pipettip gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster.
Pipetten met een grote precisie of geautomatiseerde pipetteerapparatuur zullen de precisie verhogen. Respecteer de incubatietijden.
Bereid een kalibratiecurve voor elke run; men mag geen gegevens gebruiken van voorafgaande runs.

B. **Procedure**

1. Etiketteer de gecoate buisjes in duplo voor elke kalibrator, voor elk monster, voor elke controle. Etiketteer 2 normale buizen voor de bepaling van de totaal tellingen.
2. Vortex de kalibrators, controles en monsters gedurende korte tijd en pipetteer 50 µl van elk in de desbetreffende buis.
3. Pipetteer 200 µl van de Incubatiebuffer in elke buis, met uitzondering van de totaal tellingen.
4. Incubeer gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur terwijl er voortdurend mee geschud wordt (600 rpm).
5. Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer). Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van de gecoate buis komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
6. Was de buizen met 3 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen). Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasoplossing.
7. Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer).
8. Was de buisjes nogmaals met 3 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen) en zuig op (of decanteer).
9. Na de laatste wasfase moeten de buisjes gedurende twee minuten rechtop blijven staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
10. Pipetteer 200 µl van de tracer in elke buis

11. Schud het rek met de buizen voorzichtig met de hand zodat eventueel ingesloten luchtbelllen vrijkomen.
12. Incubeer gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur terwijl er voortdurend mee geschud wordt (600 rpm).
13. Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer). Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van de gecoatete buis komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
14. Was de buizen met 3 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen). Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasoplossing.
15. Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer).
16. Was de buisjes nogmaals met 3 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen) en zuig op (of decanteer).
17. Na de laatste wasfase moeten de buisjes gedurende twee minuten rechtop blijven staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
18. Tel de buizen in een gammateller gedurende 60 seconden.

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

1. Bereken het gemiddelde voor de bepalingen in duplo.
2. Zet de cpm (ordinaat) uit voor elke kalibrator tegen de overeenkomstige β hCG -concentratie (abscis) op semi-logaritmisch of lineair millimeterpapier en teken een kalibratiecurve door de kalibratiepunten, waarbij de duidelijke uitschieters verworpen worden.
3. Lees door interpolatie de concentratie voor elke controle en voor elk monster op de kalibratiecurve.
4. Door computergestuurde gegevensreductie worden deze berekeningen vereenvoudigd.
- Indien de resultaten automatisch verwerkt worden, wordt de 4 parameter logistische functie aanbevolen voor de gepaste curve.

XII. KENMERKENDE GEGEVENS

De volgende gegevens dienen enkel ter illustratie en mogen in geen geval gebruikt worden ter vervanging van de real time kalibratiecurve.

β hCG-IRMA		cpm	B/T (%)
Totaaltelling		230469	100
Kalibrator	0 mIU/ml	299	0,1
	0,29 mIU/ml	1196	0,5
	0,96 mIU/ml	3084	1,3
	2,8 mIU/ml	8790	3,8
	8,8 mIU/ml	25501	11,1
	28 mIU/ml	68274	29,6
	56 mIU/ml	108661	47,1
	93 mIU/ml	146141	63,4

XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

- A. Detectielimiet

Twintig nulkalibrators werden bepaald, samen met een reeks andere kalibrators. De detectielimiet, omschreven als de schijnbare concentratie van twee standaarddeviaties boven de gemiddelde tellingen bij nulbinding, bedroeg 0,03 mIE/ml
- B. Specificiteit

Kruisreagerende hormones werden toegevoegd aan kalibrators met lage en hoge waarden. De schijnbare respons van β hCG werd gemeten.

Toegevoegd hormoon	β hCG CAL 1 mIE/ml	β hCG CAL 6 mIE/ml
-	0,29	56
FSH 300 mIU/ml	0,28	58
TSH 300 μ IU/ml	0,25	58
LH 300 mIU/ml	0,31	60
β LH 10000 ng/ml	46,8	86
α hCG 500 ng/ml	0,8	55

C. Precisie

BINNEN EEN TEST				TUSSEN TESTEN			
Serum	N	<X> $\pm$ SD (mIE/ml)	VC (%)	Serum	N	<X> $\pm$ SD (mIE/ml)	VC (%)
A	10	1,42 $\pm$ 0,10	7,3	C	20	1,32 $\pm$ 0,08	5,8
B	10	10,7 $\pm$ 0,3	2,5	D	20	8,9 $\pm$ 0,3	3,6

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

D. Nauwkeurigheid

RECOVERY –TEST			
Monster	Toegevoegd β hCG (mIE/ml)	Recovery van β hCG (mIE/ml)	Recovery (%)
A	0,44	0,38	87,2
	0,81	0,79	97,9
	3,66	3,88	106,0
	19,5	19,0	97,4
	37,3	36,7	98,4

VERDUNNINGSTEST			
Monster	Verdunning	Theoretische concentratie (mIE/ml)	Concentratie die bepaald werd (mIE/ml)
1	1/1	-	7,73
	1/2	3,87	4,21
	1/5	1,55	1,31
	1/10	0,77	0,76
	1/20	0,39	0,43
2	1/1	-	30,62
	1/2	15,31	15,29
	1/5	6,12	6,13
	1/10	3,06	2,88
	1/20	1,53	1,51

De monsters zijn verdund met Specimenverdunner.

- F. Tijdspanne tussen de laatste kalibrator en distributie van het monster

Zoals hieronder weergegeven wordt, blijven de resultaten van de bepaling nauwkeurig, zelfs wanneer een monster 30 minuten na toevoeging van de kalibrator in de gecoatete buizen gepipetteerd wordt.

TIJDSPANNE				
	0' (mIE/ml)	10' (mIE/ml)	20' (mIE/ml)	30' (mIE/ml)
Serum 1	1,33	1,35	1,34	1,35
Serum 2	10,27	9,96	10,56	10,49

- G. "Hook"-effect

Een monster, dat met β hCG gespiket werd tot 12800 mIE/ml , levert hogere tellingen op dan het laatste kalibratiepunt.

XIV. BEPERKINGEN

- Specimens van patiënten die voor de diagnose of behandeling preparaten hebben gekregen van monoklonale antilichamen van muizen kunnen humane anti-muis-antilichamen (HAMA) bevatten. Dergelijke specimens kunnen ofwel vals-verhoogde of vals-verlaagde waarden vertonen wanneer ze met testkits worden getest waarbij gebruik wordt gemaakt van monoklonale antilichamen van muizen.
- Heterofiele antilichamen in humaan serum kunnen reageren met reagensimmunoglobulinen, wat een effect kan hebben op in vitro immunoassays.
- Patiënten die regelmatig aan dieren of dierlijke serumproducten worden blootgesteld, kunnen vatbaar zijn voor een dergelijk effect, terwijl afwijkende waarden kunnen worden waargenomen wanneer heterofiele antilichamen aanwezig zijn. Beoordeel de resultaten zorgvuldig van patiënten van wie vermoed wordt dat ze deze antilichamen hebben.
- Als de resultaten niet overeenstemmen met andere klinische waarnemingen moet bijkomende informatie worden verkregen voordat de diagnose wordt gesteld.

XV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

- Indien de resultaten, die verkregen werden voor controle 1 en/of controle 2, niet binnen het bereik vallen zoals vermeld op het flaconetiket, dan mogen de resultaten niet gebruikt worden tenzij een bevredigende uitleg gegeven wordt voor de discrepantie.
- Indien gewenst, kan elk laboratorium zijn eigen pools voor controlemonsters maken, die dan in aliquots bewaard moeten worden in de diepvriezer.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van monsters moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.

XVI. REFERENTIE-INTERVALS

Deze waarden worden slechts als leidraad gegeven; elk laboratorium moet zijn eigen normaal bereik van waarden uitmaken.

Identificatie	Aantal subjecten	Gemiddelde (mIE/ml)
Normale subjecten	33	< 0.1 mIE/ml

XVII. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid
Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.
Deze kit bevat ¹²⁵I (halfwaardetijd: 60 dagen) , dat ioniserende X- (28 keV) en γ-stralen (35.5 keV) uitzendt.
Dit radioactieve product mag enkel overhandigd worden aan en gebruikt worden door bevoegd personeel; ontvangst, opslag, gebruik en overdracht van radioactieve producten zijn onderworpen aan de wetgeving van het land van de eindgebruiker. In geen geval mag het product toegediend worden aan mensen of dieren.
Alle handelingen met radioactief materiaal moeten plaatsvinden in een daartoe bestemde ruimte, waar uitsluitend bevoegd personeel toegelaten wordt. Een logboek met ontvangst en opslag van radioactieve materialen moet worden bijgehouden in het laboratorium. Laboratoriumapparatuur en glaswerk, dat eventueel gecontamineerd werd met radioactieve bestanddelen, moeten worden gesegregeerd om kruisbesmetting van verschillende radioisotopen te vermijden.
Als radioactief materiaal gemorst werd, dan moet dat onmiddellijk gereinigd worden in overeenstemming met de procedure voor stralingsveiligheid. Het radioactieve afval moet worden weggegooid in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften en richtlijnen van de autoriteiten waaronder het laboratorium valt. Naleving van de basisregels van stralingsveiligheid zorgt voor een juiste bescherming.
De componenten, afkomstig van menselijk bloed, in deze kit werden getest door in Europa goedgekeurde en/of door de Amerikaanse FDA goedgekeurde methoden op aanwezigheid van HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en 2 en gaven een negatief resultaat. Geen enkele bekende methode kan echter volledige garantie bieden dat derivaten van menselijk bloed geen hepatitis, aids of andere infecties overdragen. Daarom moet men reagentia, serum- of plasmamonsters behandelen in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures.
Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel infectieus materiaal.
Vermijd dat de reagentia (natriumazide als conserveermiddel) in contact komen met de huid. Azide in deze kit kan reageren met lood en koper in de afvoerleidingen en op die manier zeer explosieve metaalaziden vormen. Tijdens de wasfase moeten de afvoerleidingen ruimschoots met water nagespoeld worden om ophoping van azide te vermijden.
Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkruimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen.

XVIII. BIBLIORAFIE

1. CHEN F. et al., (1987)
Radioimmunoassay of the serum free β-subunit of human chorionic gonadotropin in trophoblastic disease.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 64:313.

2. DAWOOD M.Y. et al., (1977)
Human chorionic gonadotropin and its subunit in hydatidiform mole and choriocarcinoma.
Obstet. Gynecol., 50:172.

3. GASPARD V.J. et al., (1980)
Serum concentration of human chorionic gonadotropin and its alpha and beta subunit in Trophoblastic tumours.
Clin. Endocrinol. (Oxf.), 13:219.

4. PIERCE J.G. et al., (1981)
Glycoprotein hormones : structure and function.
Annu. Rev. Biochem., 50:465.

5. KARDANO A. et al., (1994)
Human Chorionic Gonadotropin β-Subunit Nicking enzymes in Pregnancy and Cancer Patient Serum.
J. Clin. Endocr. Metab., 79:761-767.

XIX. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	TOTAAL- TELLINGEN (ml)	KALIBRATORS (ml)	MONSTER(S) CONTROLES (ml)
Kalibrators (0-7) Monsters, Controles Incubatiebuffer	- 0.2	0.05 - 0.2	- 0.05 0.2
Incubatie	30 minuten bij kamertemperatuur terwijl er voortdurend mee geschud wordt.		
Scheiding Werk-wasoplossing Scheiding Werk-wasoplossing Scheiding	- - - - -	opzuigen (of decanteer) 3,0 opzuigen (of decanteer) 3,0 opzuigen (of decanteer)	
Tracer	0.2	0.2	0.2
Incubatie	30 minuten bij kamertemperatuur terwijl er voortdurend mee geschud wordt.		
Scheiding Werk-wasoplossing Scheiding Werk-wasoplossing Scheiding	- - - - -	opzuigen (of decanteer) 3,0 opzuigen (of decanteer) 3,0 opzuigen (of decanteer)	
Telling	Tel de buisjes gedurende 60 seconden		

DIAsource catalogusnummer: KIP1001	Nummer van de bijsluiters: 1700545/nl	Revisienummer: 101021/1
---------------------------------------	--	----------------------------

Revisiedatum: 2010-10-21

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

Free β hCG-IRMA

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von freiem β humanem Choriongonadotropin (β hCG) in Serum.

Dieser Kit ist nicht zur Evaluierung des Risikos auf Trisomie 21 bestimmt.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource Free β hCG-IRMA Kit
- B. **Katalognummer :** KIP1001 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. **Biologische Aktivität**

Das Hormon Choriongonadotropin wird während der gesamten Schwangerschaft durch die Syncytiotrophoblasten der Plazenta gebildet und wird ab dem 9. Tag nach der Ovulation ins Blut sezerniert.

hCG hat biologische Eigenschaften, die jenen von LH ähneln. Während der Schwangerschaft stimuliert dieses Plazentahormon das verbleibende Corpus luteum, das in den ersten drei Monaten der Schwangerschaft Östrogen und Progesteron sezerniert. hCG stimuliert auch das sich entwickelnde Plazentagewebe, das die verschiedenen Steroidhormone sezerniert. Während die Funktion des Corpus luteum abnimmt, steigt der Östrogen- und Progesteronspiegel parallel mit der Reifung der Plazenta an. Neben dieser Stimulierung des Luteal- und Plazentagewebes ist hCG, das die Plazenta durchquert, entscheidend zur Differenzierung des Tractus genitalis des Fötus, die um die 7. Schwangerschaftswoche stattfindet. Die fötale Hypophyse scheidet Gonadotropine erst in späteren Reifungsphasen aus.

hCG hat auch spezifische Eigenschaften von FSH und TSH, weshalb die meisten Autoren hCG als das „Ur“-Glykoproteinormon der Plazenta betrachten, das zugleich drei biologische Hypophysenhormone enthält. Das hCG mit Molekulargewicht 37.900 Dalton umfasst zwei Untereinheiten, α und β , die wie die Hormone FSH, LH und TSH nicht kovalent gebunden sind. Die hCG α -Untereinheit - Molekulargewicht 14.900 Dalton - ist chemisch den α -Untereinheiten der Hypophysenhormone ähnlich. Die β -Untereinheiten sind spezifisch für jedes Glykoproteinormon und ergeben die spezifische biologische Aktivität. Die chemischen Strukturen sind von einem Glykoproteinormon zum anderen unterschiedlich, aber bei den β -Untereinheiten gibt es eine antigene Kontinuität von einem Typ zum anderen. Die hCG β -Untereinheit ähnelt stark der LH β -Untereinheit.

B. **Klinische Anwendungen**

1. Diagnostischer und Kontrolltest während der Schwangerschaft
hCG und seine freien Untereinheiten α und β scheinen in Serum und Harn schwangerer Frauen etwa 9 Tage nach der Ovulation auf. Der freien β hCG-Spiegel steigt dann rasch an, um zwischen der 8. und 12. Woche eine Spitze zu erreichen.
2. Tumormarkertest bei trophoblastischen Tumoren
Acephalocystes racemosae und Choriokarzinome können große Mengen an nativem hCG und den beiden freien Untereinheiten α und β in den peripheren Blutkreislauf sezernieren.
3. Tumormarkertest bei nicht trophoblastischen Krebserkrankungen
10 bis 15 % der Brust-, Lungen- und Verdauungstraktkrebs geben hCG und/oder eine der beiden Untereinheiten α und β ab.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

A. Kernmerkmale

Der freies-βhCG-IRMA wurde entwickelt, um medizinischen Labors einen Assay mit zwei Kernmerkmalen zur Verfügung zu stellen:

- Eine 100%-ige Erkennung mit freier β-Kette, um die Detektion ektopischer Tumoren zu garantieren, die insbesondere eine freie β-Kette und nicht so sehr natives hCG sezernieren.
- Einen Schwangerschaftstest, der eine präzise quantitative Messung des freien βhCG-Spiegels im Serum bietet, wenn ein Protokoll mit einer Inkubation von 1 Stunde ohne Kreuzreaktion mit dimerischem hCG verwendet wird.

B. Testprinzip

Der DIASource βhCG-IRMA ist ein Radioimmuno-Assay in beschichteten Röhrchen. Mabs1, die Fänger-Antikörper, haften an der unteren inneren Oberfläche des Plastikröhrchens. In die Röhrchen zugegebene Kalibratoren oder Proben zeigen zuerst eine niedrige Affinität zu Mabs1. Zugabe von Mab2, des mit ¹²⁵I markierten Signalantikörpers, vervollständigt das System und triggert die immunologische Reaktion. Nach dem Waschen gibt die verbleibende, an den Röhrchen haftende Radioaktivität die Antigenkonzentration wieder. Die Verwendung einiger unterschiedlicher Mabs vermeidet die Hyperspezifität.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Test Kit	Farb-code	Rekonstitution			
 Mit anti βhCH - beschichtete Röhrchen (monoklonale Antikörper)	2 x 48	Rot	gebrauchsfertig			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRACER: ¹²⁵ Iodmarkiertes Anti-βhCG (monoklonale Antikörper) in Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin, Azid (<0,1%) und inertem roten Farbstoff	Ab	¹²⁵ I	1 Gefäß 22 ml 750 kBq	Rot	gebrauchsfertig	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Null Kalibrator in Humanserum mit Thymol	CAL	0	1 Gefäß lyophil.	Gelb	0,5 ml dest. Wasser zugeben	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibrator - N = 1 bis 7 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanserum mit Thymol	CAL	N	7 Gefäße lyophil.	Gelb	0,5 ml dest. Wasser zugeben	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>DIL</td><td>SPE</td></tr></table> Probenverdünner: Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin und Azid (<0,1%)	DIL	SPE	1 Gefäß 22 ml	Schwarz	gebrauchsfertig	
DIL	SPE					
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Inkubationspuffer: Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin und Azid (<0,1%)	INC	BUF	1 Gefäß 22 ml	Schwarz	gebrauchsfertig	
INC	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Waschlösung (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 Gefäß 10 ml	Braun	70 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontrollen - N = 1 oder 2 Humanserum mitThymol	CONTROL	N	2 Gefäße lyophil.	Silber	0,5 ml dest. Wasser zugeben	
CONTROL	N					

Bemerkung:

1. Benutzen Sie Probenverdünner zur Probenverdünnung.
2. 1 1mIU der Standardzubereitung ist äquivalent zu 1mIU 3rd IRP 75/551.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, wird aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

1. Dest. Wasser
2. Pipetten: 50 µl, 200 µl, 500 µl und 1 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegplastikspitzen wird empfohlen)
3. 5 ml automatische Spritze (Cornwall Typ) zum Waschen

4. Absaugsystem (optional)
5. Vortex Mixer
6. Magnetrührer
7. Schüttler für Röhrchen
8. Jegl. Gamma-Counter, der ¹²⁵I messen kann, kann verwendet werden. (minimal Yield 70%)

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. Kalibratoren** : Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 0,5 ml dest. Wasser.
- B. Kontrollen** : Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. Wasser.
- C. Waschlösung**: Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (70x) mit 69 Anteilen dest. Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Werfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages weg.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder der Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2°C bis 8°C stabil.
- Nach der Rekonstitution sind die Kalibratoren und Kontrollen bei 2°C bis 8°C 7 Tage stabil. Aliquots müssen bei längerer Aufbewahrung bei –20°C eingefroren werden und sind dann 3 Monate stabil. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist der Tracer bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2° bis 8° C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serumproben müssen bei 2 – 8°C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, ist die Aufbewahrung bei –20°C erforderlich.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

X. DURCHFÜHRUNG

A. Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum. Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur. Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden. Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten. Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Standardkurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

B. Durchführung

1. Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
2. Vortexen Sie Kalibratoren , Kontrollen und Proben kurz und geben Sie jeweils 50 µl in ihre Röhrchen.
3. Geben Sie 200 µl des Inkubationspuffers in jedes Röhrchen.
4. Inkubieren Sie 30 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (600 rpm)
5. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren Sie) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
6. Waschen Sie die Röhrchen mit 3 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
7. Saugen Sie den Inhalt jeden Röhrchens (außer Gesamtaktivität) ab.
8. Waschen Sie die Röhrchen mit 3 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie).
9. Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
10. Geben Sie 200 µl des Tracers in jedes Röhrchen.
11. Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
12. Inkubieren Sie 30 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (600 rpm)

13. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren Sie) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
14. Waschen Sie die Röhrchen mit 3 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
15. Saugen Sie den Inhalt jeden Röhrchens (außer Gesamtaktivität) ab.
16. Waschen Sie die Röhrchen mit 3 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie).
17. Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
18. Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter 60 Sekunden lang aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
2. Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration β hCG (Abszisse) ein und zeichnen Sie eine Standardkurve durch die Standardpunkte, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
3. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Standardkurve.
4. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer “4 Parameter”-Kurvenfunktion.

XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitstandardkurve verwendet werden.

β hCG-IRMA		cpm	B/T (%)
Gesamtaktivität		230469	100
Kalibrator	0 mIU/ml	299	0,1
	0,29 mIU/ml	1196	0,5
	0,96 mIU/ml	3084	1,3
	2,8 mIU/ml	8790	3,8
	8,8 mIU/ml	25501	11,1
	28 mIU/ml	68274	29,6
	56 mIU/ml	108661	47,1
	93 mIU/ml	146141	63,4

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

- A. Nachweisgrenze**
Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen.
Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswert bei Nullbindung, entsprach 0,03 mIU/ml.
- B. Spezifität**
Kreuzreaktive Hormone wurden zu einem minderwertigen und zu einem hochwertigen Kalibrator zugegeben. Das scheinbare β hCG Ergebnis wurde gemessen.

zugegeben Hormone	β hCG CAL 1 mIU/ml	β hCG CAL 6 mIU/ml
-	0,29	56
FSH 300 mIU/ml	0,28	58
TSH 300 μ IU/ml	0,25	58
LH 300 mIU/ml	0,31	60
β LH 10000 ng/ml	46,8	86
α hCG 500 ng/ml	0,8	55

C. Präzision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> $\pm$ SD (mIU/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> $\pm$ SD (mIU/ml)	CV (%)
A	10	1,42 $\pm$ 0,10	7,3	C	20	1,32 $\pm$ 0,08	5,8
B	10	10,7 $\pm$ 0,3	2,5	D	20	8,9 $\pm$ 0,3	3,6

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST			
Probe	Zugew. β hCG (mIU/ml)	Wiedergef. β hCG (mIU/ml)	Wiedergefunden (%)
A	0,44	0,38	87,2
	0,81	0,79	97,9
	3,66	3,88	106,0
	19,5	19,0	97,4
	37,3	36,7	98,4

VERDÜNNUNGSTEST			
Probe	Verdünn.	Theoret. Konz. (mIU/ml)	Gemess. Konz. (mIU/ml)
1	1/1	-	7,73
	1/2	3,87	4,21
	1/5	1,55	1,31
	1/10	0,77	0,76
	1/20	0,39	0,43
2	1/1	-	30,62
	1/2	15,31	15,29
	1/5	6,12	6,13
	1/10	3,06	2,88
	1/20	1,53	1,51

Die Proben wurden mit Probenverdünner verdünnt.

- E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe**
Es wird im Folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann gewährleistet ist, wenn die Probe 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugegeben wird.

ZEITABSTAND				
	0' (mIU/ml)	10' (mIU/ml)	20' (mIU/ml)	30' (mIU/ml)
Serum 1	1,33	1,35	1,34	1,35
Serum 2	10,27	9,96	10,56	10,49

- F. Hook-Effekt**
Eine Probe mit β hCG bis zu 12800 mIU/ml liefert höhere Messwerte als der letzte Kalibratormesswert.

XIV. ANWENDUNGSGRENZEN

- Proben von Patienten, die Zubereitungen von monoklonalen Maus-Antikörpern zur Diagnose oder Therapie erhalten haben, können humane Anti-Maus Antikörper (HAMA) enthalten. Solche Proben können entweder falsch erhöhte oder zu niedrige Werte ergeben, wenn sie mit Testsystemen getestet werden, die monoklonale Maus Antikörper enthalten.
 - Heterophile Antikörper im humanen Serum können mit Immunglobulinen der Reagenzien reagieren und so mit in vitro Immunoassays interferieren.
- Patienten, die routinemäßigen Umgang mit Tieren oder Tierseren haben, können zu dieser Interferenz neigen und so können anormale Werte in Gegenwart von heterophilen Antikörpern beobachtet werden. Ergebnisse von Patienten, bei denen diese Antikörper vermutet werden, müssen sorgfältig evaluiert werden.
- Wenn die Ergebnisse nicht mit anderen klinischen Beobachtungen übereinstimmen, sollten weitere Informationen vor der Diagnosestellung ermittelt werden.

XV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können diese Werte, ohne treffende Erklärung für die Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

XVI. REFERENZ INTERVALLE

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

Identifikation	Anzahl von Personen	Mittelwert (mIU/ml)
Gesunde Personen	33	< 0.1 mIU/ml

XVII. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit
Nur für diagnostische Zwecke.
Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 60 Tagen) , das ionisierende X (28 keV) und γ (35.5 keV) Strahlungen emittiert.
Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.
Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausrüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern. Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.
Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in den USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit darüber liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.
Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde.
Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiös betrachtet werden.
Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflussrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschrte den Abfluss gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.
Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und verwenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

XVIII. LITERATUR

1. CHEN F. et al., (1987)
Radioimmunoassay of the serum free β-subunit of human chorionic gonadotropin in trophoblastic disease.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 64:313.

2. DAWOOD M.Y. et al., (1977)
Human chorionic gonadotropin and its subunit in hydatidiform mole and choriocarcinoma.
Obstet. Gynecol., 50:172.

3. GASPARD V.J. et al., (1980)
Serum concentration of human chorionic gonadotropin and its alpha and beta subunit in Trophoblastic tumours.
Clin. Endocrinol. (Oxf.), 13:219.

4. PIERCE J.G. et al., (1981)
Glycoprotein hormones : structure and function.
Annu. Rev. Biochem., 50:465.

5. KARDANO A. et al., (1994)
Human Chorionic Gonadotropin β-Subunit Nicking enzymes in Pregnancy and Cancer Patient Serum.
J. Clin. Endocr. Metab., 79:761-767.

XIX. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT- AKTIVITÄT (ml)	KALIBRA- TOREN (ml)	PROBE(N) KONTROLLEN (ml)
Kalibratoren (0-7) Proben, Kontrollen Inkubationspuffer	- 0.2	0.05 - 0.2	- 0.05 0.2
Inkubation	30 Minuten bei RT unter ständigem Schütteln		
Trennung Waschlösung Trennung Waschlösung Trennung	- - - - -	absaugen (oder dekant.) 3,0 absaugen (oder dekant.) 3,0 absaugen (oder dekant.)	
Tracer	0.2	0.2	0.2
Inkubation	30 Minuten bei RT unter ständigem Schütteln		
Trennung Waschlösung Trennung Waschlösung Trennung	- - - - -	absaugen (oder dekant.) 3,0 absaugen (oder dekant.) 3,0 absaugen (oder dekant.)	
Gamma Counter	60 Sekunden messen		

DIAsource Katalognummer : KIP1001	Beipackzettelnummer: 1700545/de	Nummer der Originalausgabe: 101021/1
--------------------------------------	------------------------------------	---

Revisionsdatum: 2010-10-21

Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

Free β hCG-IRMA

I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro della Subunità β I
Gonadotropina Corionica Umana (β hCG) in siero.
Tale kit non è indicato per valutazione del rischio di trisomia 21.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale: DIAsource β hCG -IRMA Kit
- B. Numero di catalogo: KIP1001: 96 tests
- C. Prodotto da: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:
Tel: +32 (0) 67 88.99.99 Fax: +32 (0) 67 88.99.96

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche

La gonadotropina corionica è un ormone che viene prodotto dal sinciziotrofoblasto placentare durante l'intero periodo della gravidanza e che viene rilasciato nel sangue materno a partire dal nono giorno dall'ovulazione.

L'hCG ha caratteristiche biologiche simili a quelle dell'LH. Questo ormone placentare stimola il corpo luteo a secernere estrogeni e progesterone durante i primi tre mesi della gravidanza. L'hCG stimola inoltre lo sviluppo degli elementi placentari secernenti i vari ormoni steroidei, quando alla riduzione della funzione del corpo luteo subentra il progressivo aumento dei livelli di estrogeni e progesterone associato alla maturazione delle placenta. In aggiunta a tale azione di stimolazione del tessuto luteinico e placentare, l'hCG, grazie alla sua capacità di penetrazione della placenta, svolge un'azione essenziale nella differenziazione del tratto genitale del feto che avviene all'incirca durante la settima settimana di gravidanza. L'ipofisi fetale non secerne gonadotropina prima degli ultimi stadi di maturazione.

L'hCG presenta inoltre caratteristiche specifiche dell'FSH e del TSH ed è per questo motivo che viene considerata da alcuni come l'ormone glicoproteico placentare "ancestrale", "contenente" allo stesso tempo i tre ormoni biologici ipofisari. L'hCG, il cui peso molecolare è di 37.900 Dalton, è composta da due subunità, α e β legate non covalentemente tra loro, al pari degli ormoni FSH, LH e TSH. La subunità α dell'hCG, di 14.900 Dalton, è simile alle subunità α che costituiscono gli ormoni ipofisari. Le subunità β sono specifiche per ogni ormone glicoproteico e conferiscono la specificità dell'attività biologica. La struttura chimica è diversa per ognuno degli ormoni glicoproteici, anche se per quanto riguarda le subunità β vi è una continuità antigenica tra i diversi tipi. La subunità β -hCG è molto simile alla subunità β -LH.

B. Applicazioni cliniche

1. Test di diagnosi e di monitoraggio della gravidanza

L'hCG e le sue subunità libere α e β sono rilevabili nel siero e nelle urine di una donna in gravidanza, a partire dal nono giorno dall'ovulazione. Il livello di β hCG libera aumenta poi rapidamente, fino a raggiungere un picco tra l'ottava e la dodicesima settimana.

2. Dosaggio marker tumorale in tumori trofoblastici

Moli idatiformi e coriocarcinoma possono secernere grandi quantità di hCG e delle sue due subunità libere α e β nel sangue periferico.

3. Dosaggio marker tumorale in forme di cancro non-trofoblastico

Nel 10 - 15% dei casi di cancro della mammella, dei polmoni e del tratto digerente vi è rilascio di hCG e/o di una delle sue due subunità.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

A. Caratteristiche chiave

Il test Free β hCG IRMA è stato realizzato per fornire al laboratorio un test con due principali finalità d'utilizzo:

- 100% di rilevazione della catena β libera, per garantire l'identificazione di tumori ectopici secernenti principalmente la catena β libera rispetto alla molecola intera.
- Un test di gravidanza che garantisca il preciso dosaggio della β hCG libera in campioni di siero, utilizzando il protocollo che prevede un'ora di incubazione, senza possibilità di reazione crociata con l'hCG nella sua forma dimerica.

B. Principio del Test

Il kit DIAsource β hCG-IRMA è un dosaggio immunoradiometrico con separazione coated tube. Gli anticorpi di cattura, Mabs 1, sono adsorbiti sulla superficie interna della parte inferiore di provette di polistirene. Standard e campioni hanno dapprima una bassa affinità per i Mabs 1; l'aggiunta di anticorpi di segnale Mabs 2, marcati con ^{125}I , provocano un aumento di affinità per i Mabs 1 e l'inizio della reazione immunologica. Al termine dell'incubazione la radioattività non legata alla fase solida viene allontanata mediante lavaggio. La radioattività residua è direttamente proporzionale alla concentrazione di hGH in standard e campioni. L'utilizzo di diversi Mabs, differenti tra loro, evita problemi di iperspecificità.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione			
 Provette sensibilizzate con anticorpo anti β hCG (anticorpi monoclonali)	2 x 48	Nero	Pronte per l'uso			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>^{125}I</td></tr></table> Anti- β hCG- ^{125}I (Anticorpi monoclonali) in tampone fosfato con BSA, sodio azide (<0,1%) e un colorante inerte rosso	Ab	^{125}I	1 flacone 22 mL 750 kBq	Rosso	Pronto per l'uso	
Ab	^{125}I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibratore zero in siero umano contenente timolo	CAL	0	1 flacone liofiliz.	Giallo	Aggiungere 0,5 mL di acqua distillata	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibratore 1-7 in siero umano contenente timolo (le concentrazioni esatte dei calibratori sono riportate sulle etichette dei flaconi)	CAL	N	7 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 0,5 mL di acqua distillata	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>DIL</td><td>SPE</td></tr></table> Diluyente per campioni : Tampone fosfato con sieralbumina bovina e azide (<0,1%)	DIL	SPE	1 flacone 22 mL	Nero	Pronte per l'uso	
DIL	SPE					
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Tampone per Incubazione: tampone fosfato con sieralbumina bovina e zide (<0,1%)	INC	BUF	1 flacone 22 mL	Nero	Pronte per l'uso	
INC	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Tampone di lavaggio (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	2 flaconi 10 mL	Marrone	Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controlli: N = 1 o 2, in siero umano contenente timolo	CONTROL	N	2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 0,5 mL di acqua distillata	
CONTROL	N					

Note:

1. Utilizzare il diluyente per campioni per le diluizioni del siero.
2. 1 mIU dela preparazione standards è equivalente a 1 mIU de 3° IRP 75/551

VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

1. Acqua distillata.
2. Pipette per dispensare 50 μL , , 200 μL , 500 μL e 1 mL (si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Agitatore tipo vortex.
4. Agitatore magnetico.
5. Agitatore per provette (600 rpm)
6. Pipetta a ripetizione automatica 5 mL per i lavaggi.
7. Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
8. Contatore gamma con finestra per ^{125}I (efficienza minima 70%)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. **Calibratore:** Ricostituire il calibratore con 0,5 ml di acqua distillata.
- B. **Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
- C. **Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 69 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (70 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- § I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- § Dopo ricostituzione, calibratore e controlli sono stabili 7 giorni a 2-8°C e, suddivisi in aliquote a -20°C per periodi più lunghi per 3 mesi al massimo.
- § Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- § La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- § Dopo apertura del flacone, il marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- § Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- § Conservare i campioni di siero o plasma a 2-8°C.
- § Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C.
- § Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.

X. METODO DEL DOSAGGIO

- A. **Avvertenze generali**
Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.
Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.
L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione.
Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.
- B. **Metodo del dosaggio**
 1. Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni standard, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
 2. Agitare brevemente su vortex standard, campioni e controlli. Dispensare 50 μL di standard, campioni e controlli nelle rispettive provette.
 3. Dispensare 200 μL di Tampone per Incubazione in tutte le provette, escluse quelle per la determinazione dell'attività totale.
 4. Incubare 30 min a temperatura ambiente su agitatore (600 rpm).

5. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette (tranne in quelle per l'attività totale) facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
6. Lavare due volte tutte le provette (tranne quelle per l'attività totale) con 3 mL di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
7. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette (tranne in quelle per l'attività totale).
8. Dopo l'ultimo lavaggio, lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
9. Dispensare 200 ul di tracciante anti-βhCG-¹²⁵I in tutte le provette, comprese quelle per l'attività totale.
10. Scuotere delicatamente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
11. Incubare 30 min a temperatura ambiente su agitatore (600 rpm).
12. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette (tranne in quelle per l'attività totale) facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
13. Lavare due volte tutte le provette (tranne quelle per l'attività totale) con 3 mL di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
14. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette (tranne in quelle per l'attività totale).
15. Dopo l'ultimo lavaggio, lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
16. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
2. Costruire la curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica o lineare ponendo in ordinata le medie dei colpi per minuto (cpm) dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di βhCG. Scartare i duplicati palesemente discordanti.
3. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
4. È possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di hGH in campioni e controlli al posto della curva standard, che va eseguita per ogni dosaggio.

βhCG -IRMA		cpm	B/T (%)
Attività totale		230469	100
Calibratore	0 mIU/ml	299	0,1
	0,29 mIU/ml	1196	0,5
	0,96 mIU/ml	3084	1,3
	2,8 mIU/ml	8790	3,8
	8,8 mIU/ml	25501	11,1
	28 mIU/ml	68274	29,6
	56 mIU/ml	108661	47,1
	93 mIU/ml	146141	63,4

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Venti replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard. La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con cpm pari alla media più 2 deviazioni standard di 20 replicati dello standard zero, è risultata essere 0,03 mIU/mL.

B. Specificità

Ormoni cross-reattivi sono stati aggiunti a un calibratore a bassa e ad elevata concentrazione di βhCG.. È stata misurata la risposta apparente nel kit βhCG.

Ormone aggiunto		βhCG CAL 1 mIU/ml	βhCG CAL 6 mIU/ml
-		0,29	56
FSH	300 mIU/ml	0,28	58
TSH	300 μIU/ml	0,25	58
LH	300 mIU/ml	0,31	60
βLH	10000 ng/ml	46,8	86
αhCG	500 ng/ml	0,8	55

C. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> ± SD (mIU/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (mIU/ml)	CV (%)
A	10	1,42 ± 0,10	7,3	C	20	1,32 ± 0,08	5,8
B	10	10,7 ± 0,3	2,5	D	20	8,9 ± 0,3	3,6

D. Accuratezza

TEST DI RECUPERO			
Campione	βhCG aggiunta (mIU/ml)	βhCG recuperata (mIU/ml)	Recupero (%)
A	0,44	0,38	87,2
	0,81	0,79	97,9
	3,66	3,88	106,0
	19,5	19,0	97,4
	37,3	36,7	98,4

TEST DI DILUZIONE			
Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (mIU/ml)	Concentrazione misurata (mIU/ml)
1	1/1	-	7,73
	1/2	3,87	4,21
	1/5	1,55	1,31
	1/10	0,77	0,76
	1/20	0,39	0,43
2	1/1	-	30,62
	1/2	15,31	15,29
	1/5	6,12	6,13
	1/10	3,06	2,88
	1/20	1,53	1,51

I campioni sono stati diluiti con il diluente per campioni.

E. Tempo trascorso tra l'aggiunta dell'ultimo calibratore e il campione

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 30 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO				
Campione	0' (mIU/ml)	10' (mIU/ml)	20' (mIU/ml)	30' (mIU/ml)
Serum 1	1,33	1,35	1,34	1,35
Serum 2	10,27	9,96	10,56	10,49

F. Effetto hook

Un campione di siero con concentrazione βhCG di 12800mUI/ml dà luogo ad un segnale superiore a quello del calibratore più elevato.

XIV. LIMITAZIONI

- Campioni di pazienti che abbiano assunto preparazioni a base di anticorpi monoclonali murini a scopo diagnostico o terapeutico potrebbero contenere anticorpi umani antimurini (HAMA). Tali campioni, quando testati con metodiche basate sull'impiego di anticorpi monoclonali murini, potrebbero produrre valori falsamente elevati o ridotti.

- Nell'esecuzione di tecniche di immunodosaggio in vitro, la presenza in campioni di siero umano di anticorpi eterofili che possono reagire con immunoglobuline reattive può dar luogo ad interferenze. Pazienti sistematicamente esposti al contatto con animali o con prodotti derivanti da siero animale possono essere oggetto di tale tipo di interferenza, con conseguente riscontro di risultati anomali in caso di presenza di anticorpi eterofili. Si raccomanda pertanto di valutare attentamente i risultati relativi ai pazienti con sospetta presenza di tale tipo di anticorpo. Qualora i risultati non fossero in linea con le altre osservazioni cliniche si renderà necessaria la raccolta di ulteriori informazioni prima della formulazione di una diagnosi.

XV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote.
- I criteri di accettazione per la differenza tra i risultati doppi dei campioni devono riflettere la Buona prassi di laboratorio

XVI. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

I valori qui sotto riportati vengono dati solo come guida; ogni laboratorio deve stabilire i propri intervalli normali di valori.

Identificazione	Numero dei soggetti	Valori (mIU/ml)
Soggetti normali	33	< 0,1 mIU/ml

XVII. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza
Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.
Questo kit contiene ¹²⁵I (emivita: 60 giorni), con emissione radiazioni ionizzanti X (28keV) e γ (35,5keV).
L'acquisto, a detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.
Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.
In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori.
I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.
Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.
Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.
Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

XVIII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- CHEN F. et al., (1987)
Radioimmunoassay of the serum free β-subunit of human chorionic gonadotropin in trophoblastic disease.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 64:313.

- DAWOOD M.Y. et al., (1977)
Human chorionic gonadotropin and its subunit in hydatidiform mole and choriocarcinoma.
Obstet. Gynecol., 50:172.
- GASPARD V.J. et al., (1980)
Serum concentration of human chorionic gonadotropin and its alpha and beta subunit in Trophoblastic tumours.
Clin. Endocrinol. (Oxf.), 13:219.
- PIERCE J.G. et al., (1981)
Glycoprotein hormones : structure and function.
Annu. Rev. Biochem., 50:465.
- KARDANO A. et al., (1994)
Human Chorionic Gonadotropin β-Subunit Nicking enzymes in Pregnancy and Cancer Patient Serum.
J. Clin. Endocr. Metab., 79:761-767.

XIX. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale mL	Calibratore mL	Campioni Controlli mL
Calibratore (0 to 7)	-	0,05	-
Campioni, controlli	-	-	0,05
Tampone di Incubazione	0,2	0,2	0,2
Incubazione	30 minuti a temperatura ambiente su agitatore		
Separazione	-	aspirare (o decantare)	
Soluzione di lavaggio	-	3 mL	
Separazione	-	aspirare (o decantare)	
Soluzione di lavaggio	-	3 mL	
Separazione	-	aspirare (o decantare)	
Marcato	0,2	0,2	0,2
Incubazione	30 minuti a temperatura ambiente su agitatore		
Separazione	-	aspirare (o decantare)	
Soluzione di lavaggio	-	3 mL	
Separazione	-	aspirare (o decantare)	
Soluzione di lavaggio	-	3 mL	
Separazione	-	aspirare (o decantare)	
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

Numero di catalogo di DIASource : KIP1001	P.I. numero : 1700545/it	Revisione numero : 101021/1
--	-----------------------------	--------------------------------

Data di revisione: 2010-10-21

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

Free β hCG-IRMA

I. PRZEZNACZENIE

Oznaczenie immunoradiometryczne do ilościowego pomiaru wolnych podjednostek β gonadotropiny kosmówkowej (Chorionic Gonadotropin (β hCG)) w surowicy pochodzenia ludzkiego, metodą *in vitro*. Ten zestaw nie jest przeznaczony do oceny ryzyka wystąpienia trisomii 21 chromosomu.

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. **Nazwa firmowa:** DIASource Free β hCG-IRMA Kit
- B. **Numer katalogowy:** KIP1001: 96 oznaczeń
- C. **Wyprodukowano przez:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgia.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:

Tel: +32 (0)67 88.99.99

Fax: +32 (0)67 88.99.96

III. INFORMACJE KLINICZNE

A. Aktywność biologiczna

Gonadotropina kosmówkowa jest syntetyzowana przez syncytiotrofoblast łożyska przez cały okres ciąży i jest wykrywalna we krwi od dziewiątego dnia po owulacji.

Charakterystyka biologiczna hCG jest podobna do LH. W okresie ciąży, hormon łożyskowy pobudza pozostałe ciało żółte do wydzielania estrogenu i progesteronu w pierwszym trymestrze ciąży. Hormon hCG stymuluje również elementy tkanki łożyskowej, wydzielające różne hormony sterydowe, gdy obniża się zdolność wydzielnicza ciała żółtego, co powoduje, że poziomy estrogenu i progesteronu wzrastają wraz z dojrzewaniem łożyska. Oprócz działania stymulującego na tkankę ciała żółtego i łożyska, hCG, przechodząc przez barierę łożyskową odgrywa podstawową rolę w różnicowaniu płci u płodu, szczególnie w siódmym tygodniu ciąży. Podwzgórze płodu nie wydziela gonadotropin do późnych etapów dojrzewania.

Hormon hCG wykazuje również działanie swoiste dla FSH i TSH, co jest powodem określania tej substancji przez autorów jako "wrodzona" glikoproteina łożyskowa, działająca w tym samym czasie, co trzy biologiczne hormony podwzgórzowe. Częsteczka hCG, o masie 37,900 Daltonów, składa się z dwóch podjednostek, α i β , związanych w sposób niekowalencyjny, podobnie jak hormony FSH, LH, TSH. Podjednostka α hCG o masie 14,900 Daltonów jest podobna do podjednostek α hormonów podwzgórzowych. Podjednostka β jest swoista do poszczególnych hormonów glikoproteinowych i determinuje ich aktywność biologiczną. Struktury chemiczne różnią się pomiędzy poszczególnymi hormonami glikoproteinowymi, natomiast zachowana jest ich zbieżność antygenowa. Podjednostka β hCG jest bardzo podobna do podjednostki β LH.

B. Zastosowania kliniczne

1. Rozpoznawanie i monitorowanie ciąży
hCG i wolne podjednostki tego hormonu alfa i beta, pojawiają się w surowicy i moczu kobiet ciężarnych około 9 dnia po owulacji. Następnie poziomy wolnych β hCG gwałtownie wzrastają, osiągając wartość szczytową pomiędzy ósmym a dwunastym tygodniem ciąży.
2. Marker nowotworu w guzach trofoblastycznych
Zaśnięd groniasty i kosmówczak mogą wydzielać duże ilości natywnego hCG i dwóch wolnych podjednostek alfa i beta do krążenia obwodowego.
3. Marker nowotworu w rakach nietrofoblastycznych
Okolo 15 % raków sutka, płuca i układu trawiennego uwalnia hCG i /lub jedną z dwóch podjednostek alfa i beta.

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

A. Zagadnienia kluczowe

Oznaczenie wolnego β hCG IRMA zostało opracowane dla laboratoriów medycznych jako test mający dwa zastosowania:

- Całkowite (100%) rozpoznawanie wolnych łańcuchów beta, w celu zagwarantowania wykrywania wydzielania ektopowego przez guza, wydzielającego częścię wolne łańcuchy beta niż natywne hCG.
- Test ciążowy, pozwalający na precyzyjny, ilościowy pomiar poziomu wolnych β hCG w surowicy, przy zastosowaniu protokołu 1-godzinnej inkubacji bez reakcji krzyżowej z dimerem hCG.

B. Zasada działania testu

Test DIASource β hCG-IRMA jest dwuetapowym oznaczeniem radioimmunologicznym opartym na separacji w opłaszczonych próbkach. Mabs 1 – przeciwciała przechwytyjące – są umocowane do dolnej i wewnętrznej powierzchni plastikowej próbki. Kalibratory lub próbki, dodawane do próbek, będą na początku wykazywały niskie powinowactwo do Mabs1. Dodanie Mab2, przeciwciała sygnałowego oznakowanego ^{125}I zakończy etap i wyzwoli reakcję immunologiczną. Po przepłukaniu, stopień radioaktywności związanej z próbówką odzwierciedla stężenie antygenu. Wykorzystywanie różnych Mabs pozwala na uniknięcie nadmiernej czułości.

V. DOSTARCZONE ODCZYNNIKI

Odczynniki	Ilość	Kolor	Rekonstytucja			
 Probówki opłaszczone przeciwciałami anty-βhCG (przeciwciała monoklonalne)	2 x 48	czamy	Gotowe do zastosowania.			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> Anty-βhCG- ¹²⁵ I (przeciwciała monoklonalne) w buforze fosforanowym z albuminą z surowicy bydlęcej, azydkiem sodu (<0,1%) i czerwonym barwnikiem obojętnym.	Ab	¹²⁵ I	1 fiołka 22 ml 750 kBq	czerwony	Gotowe do zastosowania.	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Kalibrator 0 w surowicy ludzkiej z tymolem.	CAL	0	1 fiołka liofil.	żółty	Dodać 0,5 ml wody destylowanej	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibratory 1 - 7 w surowicy ludzkiej z tymolem (dokładne wartości na etykietach fiolek)	CAL	N	7 fiolek liofil.	żółty	Dodać 0,5 ml wody destylowanej	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>DIL</td><td>SPE</td></tr></table> Rozcieńczalnik próbki: bufor fosforanowy z surowicą zawierającą albuminę bydlęcą i azydek (<0,1%)	DIL	SPE	1 fiołka 22 ml	czamy	Gotowe do zastosowania.	
DIL	SPE					
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Bufor inkubacyjny: bufor fosforanowy z albuminą z surowicy bydlęcej i azydkiem (0,1%).	INC	BUF	1 fiołka 22 ml	czamy	Gotowe do zastosowania.	
INC	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Roztwór płuczący (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	2 fiolek 10 ml	brązowy	Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontrolne 1 i 2 w surowicy pochodzenia ludzkiego z tymolem	CONTROL	N	2 fiołki liofil.	srebrny	Dodać 0,5 ml wody destylowanej	
CONTROL	N					

Uwaga: 1. Do rozcieńczeń surowic wykorzystywać rozcieńczalnik przeznaczony dla próbek.
2. 1 mIU preparatu kalibratora jest równoważny 1 mIU trzeciego IRP 75/551

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

Poniższe materiały są wymagane, ale nie są dostarczone w zestawie:

1. Woda destylowana
2. Pipety do dostarczania objętości: 50 μl , 200 μl , 500 μl i 1 ml. (zaleca się stosowanie właściwych pipet z jednorazowymi końcówkami plastikowymi)
3. Mieszadło wirowe
4. Mieszadło magnetyczne
5. Wyrząsarka próbek (600 obr./min)
6. Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania
7. Układ do aspiracji (opcjonalnie)
8. Może być wykorzystywany jakikolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru ^{125}I (minimalny uzysk 70%).

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. **Kalibratory:** Rozpuścić kalibratory przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.
- B. **Kontrolne:** Kontrolne należy rekonstruować przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.
- C. **Roboczy roztwór płuczący:** Właściwą objętość roboczego roztworu płuczającego należy przygotować dodając 69 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu płuczającego (70x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszadło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór płuczający należy wylać pod koniec dnia.

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstytucją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykiecie, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Po rozpuszczeniu, kalibratory i kontrolne zachowują stabilność przez 7 dni w temperaturze 2-8°C.
W razie konieczności dłuższego przechowywania, niewielkie objętości powinny być przechowywane w temperaturze -20°C przez maksymalnie 3 miesiące. Unikać powtarzanych cykli zamrażania i rozmrażania.
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór płuczający powinien być wykorzystany w tym samym dniu.
- Po jego pierwszym zastosowaniu, znacznik izotopowy zachowuje trwałość do podanej daty ważności jeżeli jest przechowywany w oryginalnej, dobrze zamkniętej fiołce w temperaturze od 2 do 8°C.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Próbkę surowicy muszą być przechowywane w temperaturze 2-8°C.
- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 24 godzin, zaleca się przechowywanie w temperaturze -20°C.
- Unikać powtarzanych cykli zamrażania i rozmrażania.

X. PROCEDURA

A. Uwagi dotyczące obsługi

Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upływie daty ważności. Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów. Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową. Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie. Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste, jednorazowe końcówki pipet. Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia. Przestrzegać czasów inkubacji. Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.

B. Procedura

1. Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli należy oznaczyć opłaszczone próbki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 zwykłe próbki
2. Szybko wymieszać wirując: kalibratory, próbki i kontrole, i dozować po 50 μl każdej substancji do odpowiednich próbek.
3. Dozować 200 μl buforu inkubacyjnego do każdej próbki z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania.
4. Inkubować przez 30 minut w temperaturze pokojowej ciągle wyrząsając (600 obr./minutę).

5. Aspirować (lub odlać) zawartość każdej próbówki (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania). Aby usunąć cały płyn należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej próbówki.
6. Przepłukać dwukrotnie próbówki za pomocą 3 ml roztworu do płukania (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania). W trakcie dodawania roboczego roztworu płuczącego należy unikać wytwarzania piany.
7. Aspirować (lub odlać) zawartość każdej próbówki (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania).
8. Po ostatnim płukaniu, pozostawić próbówki w pozycji stojącej do góry na dwie minuty i aspirować pozostałe krople płynu.
9. Dodać 200 µl anty-βhCG-¹²⁵I (znacznik izotopowy) do wszystkich próbek w tym do nieopłaszczonych próbek do całkowitego zliczania.
10. Delikatnie potrząsać (ręcznie) stojak z próbkami, aby uwolnić wszelkie uwięzione pęcherzyki powietrza.
11. Inkubować przez 30 minut w temperaturze pokojowej ciągle wytrząsając (600 obr./minutę).
12. Aspirować (lub odlać) zawartość każdej próbówki (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania). Aby usunąć cały płyn należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej próbówki.
13. Przepłukać dwukrotnie próbówki za pomocą 3 ml roztworu do płukania (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania). W trakcie dodawania roboczego roztworu płuczącego należy unikać wytwarzania piany.
14. Aspirować (lub odlać) zawartość każdej próbówki (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania).
15. Po ostatnim płukaniu, pozostawić próbówki w pozycji stojącej do góry na dwie minuty i aspirować pozostałe krople płynu.
16. Zliczać próbówki w liczniku gamma przez 60 sekund.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

1. Obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
2. Na papierze milimetrowym lub w kratkę wykreślić c.p.m. (rzędna) dla każdego kalibratora wobec odpowiadającego stężenia βhCG (odcięta) oraz wykreślić krzywą kalibracji przez punkty kalibratora, odrzucając oczywiste wartości odbiegające od linii środkowej.
3. Odczytać stężenie dla każdej kontroli i próbki przez naniesienie na krzywą kalibracyjną.
4. Redukcja danych przy pomocy komputera pozwoli uprościć te obliczenia. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

Poniższe dane są przedstawione wyłącznie w celach przykładowych i nie powinny być nigdy stosowane zamiast rzeczywistych krzywych kalibracyjnych.

βhCG-IRMA		cpm	B/T (%)
Zliczanie całkowite		230469	100
Kalibrator	0 mIU/ml	299	0,1
	0,29 mIU/ml	1196	0,5
	0,96 mIU/ml	3084	1,3
	2,8 mIU/ml	8790	3,8
	8,8 mIU/ml	25501	11,1
	28 mIU/ml	68274	29,6
	56 mIU/ml	108661	47,1
	93 mIU/ml	146141	63,4

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

- A. Granica wykrywania
Dwadzieścia kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów. Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmienne stężenie dwóch odchyłeń standardowych powyżej przeciętnej wartości zliczania przy wiązaniu zerowym kształtowała się na poziomie 0,03 mIU/ml.
- B. Swoistość
Hormony reagujące krzyżowo były dodane do kalibratora niskich i wysokich poziomów βhCG. Oznaczano przybliżoną odpowiedź βhCG .

Dodany hormon	βhCG CAL 1 mIU/ml	βhCG CAL 6 mIU/ml
-	0,29	56
FSH 300 mIU/ml	0,28	58
TSH 300 µIU/ml	0,25	58
LH 300 mIU/ml	0,31	60
βLH 10000 ng/ml	46,8	86
αhCG 500 ng/ml	0,8	55

C. Precyzja

W SERII				POMIĘDZY SERIAMI			
Surowica	N	X ± S.D. (mIU/ml)	CV %	Surowica	N	X ± S.D. (mIU/ml)	CV %
A	10	1,42 ± 0,10	7,3	C	20	1,32 ± 0,08	5,8
B	10	10,7 ± 0,3	2,5	D	20	8,9 ± 0,3	3,6

D. Dokładność

BADANIE ODZYSKU			
Próbka	βhCG dodana (mIU/ml)	Odzyskana wartość βhCG (mIU/ml)	Odzysk (%)
A	0,44	0,38	87,2
	0,81	0,79	97,9
	3,66	3,88	106,0
	19,5	19,0	97,4
	37,3	36,7	98,4

BADANIE ROZCIEŃCZENIA			
Próbka	Rozcieńczenie	Stęż. teoretyczne (mIU/ml)	Stęż. zmierzone (mIU/ml)
1	1/1	-	7,73
	1/2	3,87	4,21
	1/5	1,55	1,31
	1/10	0,77	0,76
	1/20	0,39	0,43
2	1/1	-	30,62
	1/2	15,31	15,29
	1/5	6,12	6,13
	1/10	3,06	2,88
	1/20	1,53	1,51

Próbki zostały rozcieńczone przy pomocy Rozcieńczalnika próbki

E. Opóźnienie czasowe

Jak wykazano, wyniki pomiaru pozostają dokładne nawet wówczas, gdy od momentu dodania kalibratora do opłaszczonych próbek minęło 30 minut.

OPÓŹNIENIE				
	0' (mIU/ml)	10' (mIU/ml)	20' (mIU/ml)	30' (mIU/ml)
S 1 (mIU/ml)	1,33	1,35	1,34	1,35
S 2 (mIU/ml)	10,27	9,96	10,56	10,49

F. Efekt hook’a

Próbka surowicy o stężeniu 12800 mIU/ml βhCG daje sygnał przekraczający najwyższe stężenie kalibratora.

XIV. OGRANICZENIA

-
- Próbki od pacjentów, którzy w celach diagnostycznych lub terapeutycznych otrzymywali preparaty z mysich przeciwciał monoklonalnych, mogą zawierać ludzkie przeciwciała anty-mysie (HAMA). Próbki takie, oznaczane z użyciem zestawów testowych wykorzystujących mysie przeciwciała monoklonalne, mogą wykazywać wartości fałszywie zawyżone lub zaniżone.
-
- Przeciwciała heterofilne w ludzkiej surowicy mogą reagować z immunoglobulinami odczynnika, interferując z oznaczeniami immunologicznymi przeprowadzanymi in vitro. Pacjenci rutynowo ekspozowani na zwierzęta lub produkty z surowic zwierzęcych mogą wykazywać skłonność do takich interferencji i w razie obecności przeciwciał heterofilnych występować mogą u nich

nieprawidłowe wyniki testów. Wyniki oznaczeń próbek od pacjentów z takimi przeciwciałami należy interpretować z ostrożnością. Jeżeli wyniki nie są zgodne z obserwacjami klinicznymi, przed postawieniem rozpoznania powinny być uzyskane dodatkowe informacje.

XV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli wyniki uzyskane dla kontroli 1 i/lub 2 nie znajdują się w zakresie określonym na etykiecie fiołki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane dopóki nie uda się znaleźć właściwego wyjaśnienia tego odchylenia.
- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach. Nie wolno zamrażać i rozmrażać więcej niż dwukrotnie.
- Dopuszczalne kryteria dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium.

XVI. ZAKRESY REFERENCYJNE

Wartości przedstawione poniżej mają wyłącznie cel orientacyjny; każde laboratorium powinno opracować własne zakresy norm.

Identyfikacja	Liczba osobników	Wartość (mIU/ml)
Zdrowi osobnicy	33	< 0,1 mIU/ml

XVII. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Bezpieczeństwo

Tylko do diagnostyki *in vitro*.
Zestaw zawiera ¹²⁵I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35.5 keV).
Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.
Obsługa materiałów radioaktywnych powinno być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wyposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone substancjami radioaktywnymi powinno być oddzielone w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów.
Wszelkie plamy z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczone zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie.
Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwciał anty-HCV, anty-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności że materiały pochodzenia ludzkiego nie przeniosą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego postępowanie z odczynnikami i próbkami surowicy lub osocza powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.
Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydłace pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.
Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierają azydek sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią i ołowiem w układzie kanalizacyjnym tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków.
Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów, bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

XVIII. BIBLIOGRAFIA

1. CHEN F. et al., (1987)
Radioimmunoassay of the serum free β-subunit of human chorionic gonadotropin in trophoblastic disease.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 64:313.

2. DAWOOD M.Y. et al., (1977)
Human chorionic gonadotropin and its subunit in hydatidiform mole and choriocarcinoma.
Obstet. Gynecol., 50:172.
3. GASPARD V.J. et al., (1980)
Serum concentration of human chorionic gonadotropin and its alpha and beta subunit in Trophoblastic tumours.
Clin. Endocrinol. (Oxf.), 13:219.
4. PIERCE J.G. et al., (1981)
Glycoprotein hormones : structure and function.
Annu. Rev. Biochem., 50:465.
5. KARDANO A. et al., (1994)
Human Chorionic Gonadotropin β-Subunit Nicking enzymes in Pregnancy and Cancer Patient Serum.
J. Clin. Endocr. Metab., 79:761-767.

XIX. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

	CAŁKOWITA LICZBA ZLICZEŃ ml	KALIBRATORY ml	PRÓBK(A)I KONTROLE ml
Kalibratory (0-7) Próbki, kontrole Bufor inkubacyjny	- - 0,2	0,05 - 0,2	- 0,05 0,2
Inkubacja	30 minut w temperaturze pokojowej ciągle wytrząsając		
Rozdzielenie Roztwór płuczący Rozdzielenie Roztwór płuczający Rozdzielenie	- - - - -	Aspiracja (lub odlewanie) 3,0 Aspiracja (lub odlewanie) 3,0 Aspiracja (lub odlewanie)	
Znacznik izotopowy	0,2	0,2	0,2
Inkubacja	30 minut w temperaturze pokojowej ciągle wytrząsając		
Rozdzielenie Roztwór płuczający Rozdzielenie Roztwór płuczający Rozdzielenie	- - - - -	Aspiracja (lub odlewanie) 3,0 Aspiracja (lub odlewanie) 3,0 Aspiracja (lub odlewanie)	
Zliczanie	Zliczanie próbek przez 60 sekund		

Nr katalogowy DIASource KIP1001	Numer P.I. 1700545/pl	Nr aktualizacji : 101021/1
------------------------------------	--------------------------	-------------------------------

Data wydania : 2010-10-21

	<u>Used symbols</u>
	Consult instructions for use
	Storage temperature
	Use by
LOT	Batch code
REF	Catalogue number
CONTROL	Control
I V D	In vitro diagnostic medical device
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
WASH SOLN CONC	Wash solution concentrated
CAL 0	Zero calibrator
CAL N	Calibrator #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer concentrated
Ab 125I CONC	Tracer concentrated
	Tubes
INC BUF	Incubation buffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Dilution buffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Calibrator diluent
REC SOLN	Reconstitution solution
PEG	Polyethylene glycol
EXTR SOLN	Extraction solution
ELU SOLN	Elution solution
GEL	Bond Elut Silica cartridges
PRE SOLN	Pre-treatment solution
NEUTR SOLN	Neutralization solution
TRACEUR BUF	Tracer buffer
	Microtiterplate
Ab HRP	HRP Conjugate
Ag HRP	HRP Conjugate
Ab HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
Ag HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
CONJ BUF	Conjugate buffer
CHROM TMB CONC	Chromogenic TMB concentrate
CHROM TMB	Chromogenic TMB solution
SUB BUF	Substrate buffer
STOP SOLN	Stop solution
INC SER	Incubation serum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugate
SUB PNPP	Substrate PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin conjugate concentrate
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentrate
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotin conjugate
Ab	Specific Antibody
SAV HRP CONC	Streptavidin HRP concentrate
NSB	Non-specific binding
2nd Ab	2nd Antibody
ACID BUF	Acidification Buffer

	<u>Symboles utilisés</u>
	Consulter les instructions d'utilisation
	Température de conservation
	Utiliser jusqu'à
LOT	Numéro de lot
REF	Référence de catalogue
CONTROL	Contrôle
I V D	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Fabricant
	Contenu suffisant pour <n> tests
WASH SOLN CONC	Solution de lavage concentrée
CAL 0	Calibrateur zéro
CAL N	Calibrateur #
CONTROL N	Contrôle #
Ag 125I	Traceur
Ab 125I	Traceur
Ag 125I CONC	Traceur concentré
Ab 125I CONC	Traceur concentré
	Tubes
INC BUF	Tampon d'incubation
ACETONITRILE	Acétonitrile
SERUM	Sérum
DIL SPE	Diluant du spécimen
DIL BUF	Tampon de dilution
ANTISERUM	Antisérum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbant
DIL CAL	Diluant de calibrateur
REC SOLN	Solution de reconstitution
PEG	Glycol Polyéthylène
EXTR SOLN	Solution d'extraction
ELU SOLN	Solution d'élution
GEL	Cartouches Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solution de pré-traitement
NEUTR SOLN	Solution de neutralisation
TRACEUR BUF	Tampon traceur
TIT	Microplaque de titration
Ab HRP	HRP Conjugué
Ag HRP	HRP Conjugué
Ab HRP CONC	HRP Conjugué concentré
Ag HRP CONC	HRP Conjugué concentré
CONJ BUF	Tampon conjugué
CHROM TMB CONC	Chromogène TMB concentré
CHROM TMB	Solution chromogène TMB
SUB BUF	Tampon substrat
STOP SOLN	Solution d'arrêt
INC SER	Sérum d'incubation
BUF	Tampon
Ab AP	AP Conjugué
SUB PNPP	Tampon PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotine conjugué concentré
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentré
ASS BUF	Tampon de test
Ab BIOT	Biotine conjugué
Ab	Anticorps spécifique
SAV HRP CONC	Concentré streptavidine HRP
NSB	Liant non spécifique
2nd Ab	Second anticorps
ACID BUF	Tampon d'acidification

	<u>Gebruikte symbolen</u>
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Bewaartemperatuur
	Houdbaar tot
LOT	Lotnummer
REF	Catalogusnummer
CONTROL	Controle
IVD	Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek
	Fabrikant
	Inhoud voldoende voor <n> testen
WASH SOLN CONC	Wasoplossing, geconcentreerd
CAL 0	Nulkalibrator
CAL N	Kalibrator #
CONTROL N	Controle #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer geconcentreerd
Ab 125I CONC	Tracer geconcentreerd
	Buisjes
INC BUF	Incubatiebuffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Verdunningsbuffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Kalibratorverdunner
REC SOLN	Reconstitutieoplossing
PEG	Polyethyleen glycol
EXTR SOLN	Extractieoplossing
ELU SOLN	Elutieoplossing
GEL	Bond Elut Silica kolom
PRE SOLN	Pre-behandelingsoplossing
NEUTR SOLN	Neutralisatieoplossing
TRACEUR BUF	Tracerbuffer
	Microtiterplaat
Ab HRP	HRP Conjugaat
Ag HRP	HRP Conjugaat
Ab HRP CONC	HRP Conjugaat geconcentreerd
Ag HRP CONC	HRP Conjugaat geconcentreerd
CONJ BUF	Conjugaat buffer
CHROM TMB CONC	Chromogene TMB geconcentreerd
CHROM TMB	Chromogene Oplossing TMB
SUB BUF	Substraatbuffer
STOP SOLN	Stopoplossing
INC SER	Incubatieserum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugaat
SUB PNPP	Substraat PNPP
BIOT CONJ CONC	Geconcentreerd Biotine conjugaat
AVID HRP CONC	Geconcentreerd Avidine-HRP conjugaat
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotine conjugaat
Ab	Specifiek antilichaam
SAV HRP CONC	Streptavidine-HRP concentraat
NSB	Aspecifieke binding
2nd Ab	2de antilichaam
ACID BUF	Verzurringsbuffer

	<u>Gebrauchte Symbolen</u>
	Gebrauchsanweisung beachten
	Lagern bei
	Verwendbar bis
LOT	Chargenbezeichnung
REF	Bestellnummer
CONTROL	Kontrolle
I V D	In Vitro Diagnostikum
	Hersteller
	Ausreichend für <n> Ansätze
WASH SOLN CONC	Waschlösung-Konzentrat
CAL 0	Null kalibrator
CAL N	Kalibrator #
CONTROL N	Kontrolle #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer Konzentrat
Ab 125I CONC	Tracer Konzentrat
	Röhrchen
INC BUF	Inkubationspuffer
ACETONITRILE	Azetonitril
SERUM	Humanserum
DIL SPE	Probenverdünner
DIL BUF	Verdünnungspuffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunadsorbens
DIL CAL	Kalibratorverdünnung
REC SOLN	Rekonstitutionslösung
PEG	Polyethylenglykol
EXTR SOLN	Extraktionslösung
ELU SOLN	Eluierungslösung
GEL	Bond Elut Silikakartuschen
PRE SOLN	Vorbehandlungslösung
NEUTR SOLN	Neutralisierungslösung
TRACEUR BUF	Tracer-Puffer
U	Mikrotiterplatte
Ab HRP	HRP Konjugat
Ag HRP	HRP Konjugat
Ab HRP CONC	HRP Konjugat Konzentrat
Ag HRP CONC	HRP Konjugat Konzentrat
CONJ BUF	Konjugatpuffer
CHROM TMB CONC	Chromogenes TMB Konzentrat
CHROM TMB	Farblösung TMB
SUB BUF	Substratpuffer
STOP SOLN	Stopplösung
INC SER	Inkubationsserum
BUF	Puffer
Ab AP	AP Konjugat
SUB PNPP	Substrat PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin-Konjugat-Konzentrat
AVID HRP CONC	Avidin-HRP-Konzentrat
ASS BUF	Assaypuffer
Ab BIOT	Biotin-Konjugat
Ab	Spezifischer Antikörper
SAV HRP CONC	HRP Streptavidinkonzentrat
NSB	Unspezifische Bindung
2nd Ab	Sekundärer Antikörper
ACID BUF	Ansäuerungspuffer

	<u>Simboli utilizzati</u>
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Limitazioni di temperatura
	Utilizzare entro
LOT	Numero di lotto
REF	Numero di catalogo
CONTROL	Controllo
I V D	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Fabbricante
	Contenuto sufficiente per <n> saggi
WASH SOLN CONC	Tampone di lavaggio concentrato
CAL 0	Calibratore zero
CAL N	Standard #
CONTROL N	Controllo #
Ag 125I	Marcato
Ab 125I	Marcato
Ag 125I CONC	Marcato concentrato
Ab 125I CONC	Marcato concentrato
	Provette
INC BUF	Tampone incubazione
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Siero
DIL SPE	Diluente campione
DIL BUF	Tampone diluizione
ANTISERUM	Antisiero
IMMUNOADSORBENT	Immunoassorbente
DIL CAL	Diluente calibratore
REC SOLN	Soluzione di ricostituzione
PEG	Polietilenglicole
EXTR SOLN	Soluzione di estrazione
ELU SOLN	Soluzione di eluizione
GEL	Cartucce di silice bond elut
PRE SOLN	Soluzione di pretrattamento
NEUTR SOLN	Soluzione di neutralizzazione
TRACEUR BUF	Tracer Buffer
	Piastra di microtitolazione
Ab HRP	HRP Coniugato
Ag HRP	HRP Coniugato
Ab HRP CONC	HRP Coniugato concentrato
Ag HRP CONC	HRP Coniugato concentrato
CONJ BUF	Buffer coniugato
CHROM TMB CONC	Cromogena TMB concentrato
CHROM TMB	Soluzione cromogena TMB
SUB BUF	Tampone substrato
STOP SOLN	Soluzione di arresto
INC SER	Incubazione con siero
BUF	Buffer
Ab AP	AP Coniugato
SUB PNPP	Substrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrato coniugato con biotina
AVID HRP CONC	Concentrato avidina HRP
ASS BUF	Soluzione tampone per test
Ab BIOT	Coniugato con biotina
Ab	Anticorpo Specifico
SAV HRP CONC	Streptavidina-HRP concentrata
NSB	Legame non-specifico
2nd Ab	2° Anticorpo
ACID BUF	Tampone Acidificante

		<u>Stosowane symbole</u>
		Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją
		Temperatura przechowywania
		Zużyć przed
LOT		Kod serii
REF		Numer katalogowy
CONTROL		Kontrola
I V D		Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro
		Producent
		Zawartość wystarczająca do <n> testów
WASH SOLN CONC		Roztwór płuczący stężony
CAL 0		Kalibrator zerowy
CAL N		Kalibrator nr
CONTROL N		Kontrola nr
Ag 125I		Znacznik izotopowy
Ab 125I		Znacznik izotopowy
Ag 125I CONC		Znacznik izotopowy stężony
Ab 125I CONC		Znacznik izotopowy stężony
		Probówki
INC BUF		Wymagana inkubacja buforu
ACETONITRILE		Acetonitryl
SERUM		Surowica
DIL SPE		Rozcieńczalnik próbek
DIL BUF		Bufor do rozcieńczania
ANTISERUM		Antysurowica
IMMUNOADSORBENT		Immunoabsorbent
DIL CAL		Rozcieńczalnik kalibratora
REC SOLN		Roztwór do rozcieńczania
PEG		Glikol poli(oksy)etylenowy
EXTR SOLN		Roztwór ekstrakcyjny
ELU SOLN		Roztwór elucyjny
GEL		Kolumny krzemionkowe Bond Elut
PRE SOLN		Roztwór do przygotowania wstępnego
NEUTR SOLN		Roztwór neutralizujący
TRACEUR BUF		Bufor znacznika
ULF		mikropłytki
Ab HRP		Koniugat peroksydazy chrzanowej
Ag HRP		Koniugat peroksydazy chrzanowej
Ab HRP CONC		Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej
Ag HRP CONC		Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej
CONJ BUF		Bufor do koniugacji
CHROM TMB CONC		Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzydyny)
CHROM TMB		Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzydyny)
SUB BUF		Bufor substratu
STOP SOLN		Roztwór zatrzymujący reakcję
INC SER		Wymagana inkubacja surowicy
BUF		Bufor
Ab AP		Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)
SUB PNPP		p-nitrofenylofosforan substratowy
BIOT CONJ CONC		Koncentrat koniugatu biotyny
AVID HRP CONC		Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną
ASS BUF		Bufor do oznaczania
Ab BIOT		Koniugatu biotyny
Ab		Przeciwciało swoiste
SAV HRP CONC		Koncentrat streptawidyny HRP
NSB		Wiązanie nieswoiste
2nd Ab		Drugie przeciwciało
ACID BUF		Bufor zakwaszający