

## Inserto Gonadotropina Coriónica Humana-β (hCG)

MONOBIND, INC.  
Gonadotropina Coriónica Humana-β  
Código de Producto: 825-300

### Intención de uso:

La determinación cuantitativa de la concentración de la Gonadotropina Coriónica en suero humano o plasma por un micro plato de análisis Inmunoenzimométrico.

### RESUMEN Y EXPLICACION DE LA PRUEBA.

La concentración de la gonadotropina coriónica humana se incrementa dramáticamente en la sangre y orina durante un embarazo normal. hCG es secretada por el recubrimiento de la placenta, comenzando con la trofoblast primitiva, casi desde el tiempo de la implantación, y sirve para soportar el corpus luteum durante las primeras semanas de embarazo. hCG o glicoproteínas similares hCG pueden también ser producidas por una amplia variedad de tumores trofoblastic y no trofoblastic. La medición de hCG, por los sistemas de análisis con sensibilidad adecuada y especificidad han proveído de un gran valor en la detección de embarazo y el diagnóstico temprano de desordenes en el embarazo.

De acuerdo a la literatura, hCG es detectable en un tiempo de tan solo 10 días después de la ovulación, alcanzando los 100mIU/ml en el primer periodo perdido. Por el tiempo de la siguiente ovulación, los niveles de hCG son 200 mIU/ml (aproximadamente 28 días después de la concepción)(1). Un pico de 50,000 o hasta 100,000 mIU/ml es obtenido en el tercer mes, entonces después un declive gradual se observa. (2,3).

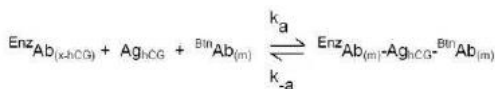
En este método, el calibrador hCG, el espécimen del paciente o el control se agrega a un pozo cubierto de streptavidin. Biotinilado monoclonal y los anticuerpos etiquetados enzima (dirigidos contra epítomes distintos y diversos de hCG) se agregan y se mezcla del reactivo. La reacción entre los varios anticuerpos de hCG nativo forma un complejo de sándwich que se enlaza con el streptavidin cubierto al pozo. Después de la terminación del período requerido de la incubación, el anticuerpo de la enzima-gonadotropina coriónica conjugada encauadrada es separado de la conjugación desatada de la enzima-gonadotropina coriónica por la aspiración o la decantación. La actividad de la enzima presente en la superficie del pozo es cuantificada por la reacción con un sustrato conveniente para producir color.

El empleo de varias referencias de suero con niveles conocidos de gonadotropina coriónica permite la construcción de un gráfico de la actividad y de la concentración. De la comparación de la curva de la reacción a cierta dosis, la actividad de un espécimen desconocido se puede correlacionar con la concentración de gonadotropina coriónica.

### PRINCIPIO

Análisis Inmunoenzimométrico (Tipo 3):

Los reactivos esenciales requeridos por un análisis Inmunoenzimométrico incluyen alta afinidad y anticuerpos específicos (enzima e inmovilizado), diferentes y con reconocimiento distinto del epítome, en exceso, y antígeno nativo. En este procedimiento, la inmovilización toma lugar durante el análisis en la superficie del micro pozo a través de la interacción de streptavidin recubierto en el pozo y el exógeno agregado biotinilado monoclonal al anticuerpo de anti-hCG. Mezclando el anticuerpo inmovilizado, conjugación del enzima-antígeno etiquetado y un suero que contienen el antígeno nativo, una reacción de la competición resulta entre el antígeno nativo y los anticuerpos sin competencia o steric hidrance, para formar un sándwich complejo soluble. La interacción es ilustrada por la siguiente ecuación:



$\text{B}^{\text{In}}\text{Ab}_{(m)}$  = Anticuerpo Monoclonal Biotinylated (Cantidad en Exceso)

$\text{Ag}_{hCG}$  = Antígeno Nativo (Cantidad Variable)

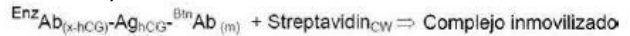
$\text{EnzAb}_{(x-hCG)}$  = Enzima-Anticuerpo Etiquetado (Cantidad en Exceso)

$\text{EnzAb}_{(hCG)}-\text{Ag}_{hCG}-\text{B}^{\text{In}}\text{Ab}_{(m)}$  = Antígeno-Complejo Sandwich Anticuerpo

$k_a$  = Valor Constante de Asociación

$k_{-a}$  = Valor Constante de Disociación

Simultáneamente, el complejo es depositado en el pozo a través de la reacción de alta afinidad de streptavidin y el anticuerpo biotinylated. Esta interacción esta ilustrada abajo:



$\text{Streptavidin}_{\text{CW}}$  = Streptavidin inmovilizado en pozo.

Complejo inmovilizado = complejo sandwich etiquetado al pozo.

Después de que se obtiene el equilibrio, la fracción del anticuerpo-unido es separado del antígeno desatado por la decantación o la aspiración. La actividad enzimática en la fracción del anticuerpo-limite es directamente proporcional a la concentración nativa del antígeno. Utilizando de varias referencias del suero de los valores sabidos del antígeno, una curva de la reacción a cierta dosis puede ser generada de la cual la concentración del antígeno de un desconocido puede ser comprobada.

### REACTIVOS

#### MATERIAL PROVEEIDO

A. Calibradores hCG-1ml/vial - Iconos A-F

Seis (6) frascos de referencia para el antígeno hCG en los niveles de 0(A), 5(B), 25(C), 50(D), 100(E) y 250(F) mIU/ml\*. Almacene a 2-8°C. Se ha agregado un preservativo.

\*Nota: Los calibradores, basados en suero humano, se calibraron usando una preparación de referencia, el cual fue ensayado contra el WHO 3rd IS (75/537).

B. Reactivo de Enzima hCG - 13ml/- frasco del icono

Un (1) frasco o que contiene la enzima etiquetada del anticuerpo de afinidad purificado, biotinilado monoclonal de Raton IgG en solución, tinte y preservativo. Almacene a 2-8°C.

C. Microplato revestido Streptavidin - 96 pozos - icono ?

Un (1) microplato de 96 pozos cubierto con streptavidin y empaquetado en una bolsa de aluminio con un agente deshidratado. Almacénesse a 2-8°C.

D. Solución Concentrada Lavadora--20ml - icono

Un (1) frasco que contiene un surfactante en solución salina. Un preservativo ha sido agregado. Almacénesse a 2-8 °C.

E. Sustrato A -- 7ml/frasco icono S

Un (1) frasco que contiene tetrametilbenzidina (TMB) en solución. Almacén en 2-8°C.

F. Sustrato B --7ml/frasco icono S

Un (1) frasco que contiene el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en solución. Almacénesse en 2-8°C.

G. SOLUCION DE PARO --8ml/frasco icono

Un (1) frasco que contiene ácido fuerte (1N HCl). Almacénesse en 2-8°C.

H. Instrucciones del producto.

Nota 1: No utilice los reactivos más allá de la fecha de vencimiento del kit. Nota 2:

Los reactivos abiertos son estables por sesenta (60) días cuando están almacenados en 2-8°C.

Nota 3: Los reactivos son para una sola microplaca de 96-pozos.

### Material Requerido pero no Proporcionado:

1. Pipeta capaz de entregar los volúmenes 50µl con una precisión mejor de 1.5%.
2. Dispensadores para las entregas repetidas de los volúmenes 0.100ml y 0.300ml con una precisión de mejor de 1.5%.
3. Lavador de Micro placas o una botella de apretón (opcional).
4. Lector de Micro placa con filtros de 450nm & 620nm.
5. Papel absorbente para retirar los excesos de los pozos de la micro placa.
6. Plástico envolvente o tapa para la micro placa para los pasos de la incubación.
7. Aspirador de vacío (opcional) para los pasos de lavado.
8. Contador de tiempo.
9. Materiales del control de calidad

### PRECAUCIONES

**Para el Uso De Diagnóstico In Vitro No Para el Uso Interno o Externo en Seres Humanos o Animales**

Todos los productos que contienen el suero humano han sido encontrados para ser no-reactivos para el antígeno superficial de la hepatitis B, los anticuerpos del VIH 1&2 y de HCV por los reactivos con licencia del FDA. Puesto que ninguna prueba sabida puede ofrecer termine el aseguramiento que los agentes infecciosos están

ausentes, todos los productos humanos del suero deben ser dirigidos como potencialmente peligrosos y capaces de transmitir enfermedad. Los buenos procedimientos del laboratorio para manejar productos de la sangre se pueden encontrar en el Centro para el Control de Enfermedad/el Instituto Nacional de la Salud, "Biosseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos," 2da Edición, 1988, publicación No. (CDC) 88-8395 de HHS.

## RECOLECCION DE LA MUESTRA Y PREPARACION

Los especímenes deben ser sangre, suero en tipo y tener las precauciones generales en la colección de muestras del venipuntura. Para la comparación exacta a los valores normales establecidos, una muestra de ayuno del suero de la mañana debe ser obtenida. La sangre se debe recoger en un tubo liso de venipuntura de tapón rojo sin añadidos o anticoagulantes. Permita que la sangre coagule. Centrifugue el espécimen para separar el suero de las células. Las muestras se pueden refrigerar en 2-8°C por un período máximo de cinco (5) días. Si el espécimen no se puede probar dentro de este tiempo, la muestra se puede almacenar en las temperaturas de -20°C por hasta 30 días. Evite congelar y deshelar. Cuando analice en duplicado, se requieren 0.05 ml del espécimen.

## PREPARACION DE LOS REACTIVOS

### 1. SOLUCION LAVADORA.

Diluir el contenido del concentrado lavador a 1000ml con agua destilada o desionizada en un contenedor adecuado. Almacénese a temperatura ambiente entre los 20-27°C. por no más de 60 días.

### 2. SOLUCIÓN DE TRABAJO SUSTRATO.

Vierta el contenido del frasco etiquetado con Solución "A" en el frasco etiquetado con Solución "B". Coloque la tapa amarilla sobre el frasco claro para fácil identificación. Mezcle y guarde a 2-8°C.

Nota: No se use el sustrato de trabajo si este se ve azul.

## PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Antes de proceder con el análisis, tenga todos los reactivos, referencias del suero y controles a la temperatura ambiente (20 - 27°C).

- Ajuste el formato de los pozos de las micro placas para que cada referencia del suero, control y espécimen del paciente sean analizados en duplicado. Guarde los micropozos nuevamente dentro del bolso de aluminio, séllela y almacénela en 2-8°C.
- Mida con una pipeta 0.025 ml (25µl) de la referencia, del control o del espécimen apropiado del suero en el pozo asignado.
- Agregue 0.100 ml (100µl) de la solución del reactivo de la enzima hCG.
- Remolinar el micro placa suavemente por 20-30 segundos para mezclar y cubrir.
- Incuba 60 minutos en la temperatura ambiente.
- Deseche el contenido del micro placa por decantación o la aspiración. Si decanta, golpee ligeramente y borre la placa seca con el papel absorbente.
- Agregue 300µl de la solución lavadora (véase la sección de la preparación del reactivo), decántelo (golpee y borre) o aspirelo. Repita dos (2) veces adicionales para un total de tres (3) lavadas. Una lavadora automática o manual de la placa puede ser utilizada. Siga las instrucciones del fabricante para el uso apropiado. Si se emplea una botella de apretón, llene cada uno bien presionando el envase (evite burbujas de aire) para dispensar la lavada. Decante la lavada y repita dos (2) veces adicionales.
- Agregue 0.100 ml (100µl) de solución activadora del sustrato a todos los pozos (véase la sección de la preparación del reactivo). Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias de tiempo de reacción entre los pozos. **NO AGITE DESPUES DE ADICIONAL EL SUSTRATO**
- Incube en la temperatura ambiente por quince (15) minutos. 10. Agregue 0.050ml (50µl) de la solución de paro a cada pozo y mezcle suavemente por 15-20 segundos. Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias del tiempo de reacción entre los pozos.
- Lea la absorbencia en cada pozo en los 450nm (con una longitud de onda de referencia de 620-630nm para reducir al mínimo imperfecciones del pozo) en un lector del micro placa. Los resultados se deben leer en el plazo de treinta (30) minutos de agregar la solución de paro

## CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe tener controles de ensayo en bajo, medio y alto rango de la curva de la reacción para monitorear el buen funcionamiento del ensayo. Estos controles deben ser tratados como desconocidos y determinar los valores en cada método de prueba realizada. Las tablas de control de Calidad deben mantenerse para seguir el funcionamiento de los reactivos proveídos. Los métodos estadísticos pertinentes deben ser empleados para comprobar las tendencias. Desviaciones significativas del funcionamiento establecido pueden indicar un cambio experimental en las condiciones o degradación del kit de reactivos. Reactivos frescos deben usarse para determinar la razón de las variaciones.

## CALCULO DE RESULTADOS

Una curva en la reacción se usa para comprobar la concentración de gonadotropina coriónica humana en especímenes desconocidos.

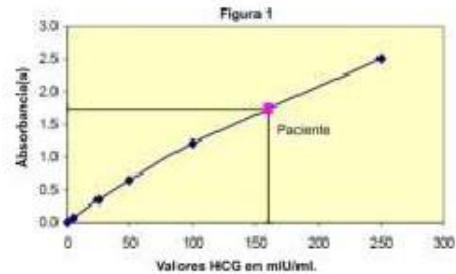
- Registre la absorbencia obtenida del listado del lector del micro placas conforme al ejemplo 1.
- Trace la absorbencia para cada referencia duplicada del suero contra la concentración correspondiente de hCG en mIU/ml en el papel de gráfico lineal. (No promedie las referencias de los duplicados del suero antes de trazar)
- Dibuje la mejor curva a través de los puntos trazados.

4. Para determinar la concentración del hCG para un desconocido, localice la absorbencia promedio de los duplicados para cada desconocido en el eje del gráfico, encuentre el punto que se interseca en la curva, y lea la concentración (en mIU/ml) del eje del gráfico (los duplicados del desconocido se pueden hacer un promedio según lo indicado). En el siguiente ejemplo, la absorbencia promedio (1.745) interseca la curva de respuesta a 157 mIU/ml de la concentración de hCG (ver Ejemplo 1)

EJEMPLO 1

Muestra	Pozo	Abs (A)	Signif. Abs (A)	Valor (mIU/ml)
Cal A	A1	0.002	0.004	0
	B1	0.005		
Cal B	C1	0.073	0.071	5
	D1	0.069		
Cal C	E1	0.340	0.350	25
	F1	0.360		
Cal D	G1	0.637	0.650	50
	H1	0.663		
Cal E	A2	1.223	1.212	100
	B2	1.199		
Cal F	C2	2.518	2.502	250
	D2	2.486		
Ctrl 1	E2	0.075	0.076	5.8
	F2	0.077		
Ctrl 2	G2	0.280	0.290	21.9
	H2	0.301		
Pacien 1	A3	1.736	1.745	157
	B3	1.754		

Nota: El software de la reducción de datos de la computadora diseñado para los análisis de ELISA se puede también utilizar para la reducción de datos.



\* Las informaciones presentadas en el Ejemplo 1 y figura 1 son ilustrativas solamente no deben usarse para basarse en la curva preparada con cada ensayo.

## PARAMETROS DEL CONTROL DE CALIDAD

En orden para que los resultados del análisis sean considerados válidos los criterios siguientes deben ser conocidos:

- La absorbencia (OD) del calibrador F debe ser ? 1.3.
- Cuatro fuera de seis piscinas de control de calidad deben estar dentro de los rangos establecidos.

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

### A. Funcionamiento del Análisis.

- Es importante que el tiempo de la reacción en cada uno pozos este llevada a cabo constante para que los resultados se produzcan. El medir con una pipeta de muestras no debe extender más allá de diez (10) minutos para evitar la deriva del análisis. Si se utiliza más de una (1) placa, se recomienda repetir la curva de la reacción a cierta dosis.
- La adición de la solución del sustrato inicia una reacción cinética, que es terminada por la adición de la solución de stop. Por lo tanto, la adición del sustrato y de la solución de paro se agrega en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
- Los lectores de la placa miden verticalmente. No toque el fondo de los pozos.
- El no retirar la solución adecuadamente en el paso del lavado y de la aspiración o de la decantación puede dar lugar a la réplica pobre y a resultados falsos.
- Las muestras que puedan estar contaminadas micro biológicamente, no deben ser usadas en el análisis. La lipemia elevada o especímenes hemolizados no deben ser usados.
- Especímenes de pacientes con concentraciones de hCG arriba de 250mIU/ml deben ser diluidos con suero normal masculino (hCG < 1 mIU/ml) y re-analizada. Las concentraciones de las muestras se obtienen por la multiplicidad de resultados por el factor de dilución.

## B. Interpretación

1. Si la reducción de datos controlados de la computadora se utiliza para interpretar los resultados de la prueba, es imperativo que los valores predichos para los calibradores varíen dentro del 10% de las concentraciones asignadas.
  2. Resultados Positivos falsos pueden ocurrir en la presencia de una amplia variedad de tumores trophoblastic y no trophoblastic que segregan hCG. Así pues, La posibilidad de un hCG segregando neoplasia debe ser eliminada prioritariamente al diagnóstico del embarazo.
  3. Así, resultados positivos falsos pueden ser vistos cuando se analicen los especímenes de sus individuales tomando la droga Pergonal\* y Clomid\*\*.
  4. Adicionalmente Pergonal puede estar seguida con una inyección de hCG.
  5. Micro abortos espontáneos y embarazos ectópicos pueden tender a tener valores que son menores que los esperados durante un embarazo normal mientras que valores altos son vistos continuamente en múltiples embarazos.
  6. Siguiendo los abortos terapéuticos, la hCG detectable puede persistir por un periodo de 3 a 4 semanas. La desaparición del valor de hCG, después de un aborto espontáneo, puede variar dependiendo de una cantidad de residuos viables trophoblast (4,5,6,7).
- \*Pegonal es una marca registrada de Serono Laboratorios, Inc\*\*Clomid es una marca registrada de Merriel-National Laboratorios

## RANGOS ESPERADOS Y VALORES

Un estudio de un normal adulto aparentemente normal fue tomado para determinar valores previstos para el sistema de pruebas por micro plato de hCG por ELISA. Los valores de significado (X) desviaciones estándar (?) y rangos esperados ( $\pm 2$ ) están presentados en la tabla 1.

Número	Significado	Desviación Estándar	Rangos Esperados ( $\pm 2$ )
25	2.9	1.4	0.1 - 5.7

Niveles esperados para hCG durante el embarazo normal (3) se presentan en la tabla 2.

1ª Semana	10 - 30
2ª Semana	30 - 100
3ª Semana	100 - 1000
4ª Semana	1,000 - 10,000
2º y 3º Mes	30,000 - 100,000
2º Trimestre	10,000 - 30,000
3er Trimestre	5,00 - 15,000

Es importante tener presente que el establecimiento de una gama de los valores que se pueden esperar ser encontrado por un método dado para una población de personas "normal" es dependiente sobre una multiplicidad de factores: la especificidad del método, de la población probada y de la precisión del método en las manos del analista. Por estas razones cada laboratorio debe depender de la gama de valores esperados establecidos por el fabricante solamente hasta que una lata interna de la gama determinada por los analistas usando el método con una población indígena al área en la cual el laboratorio está situado.

## CA RACTERISTICAS DE ACTUACIÓN

La precisión en y entre la precisión del análisis del procedimiento de hCG ELISA Micro placa fue determinada por análisis en tres diversos niveles de los sueros del control. El número (N), el valor medio(X), la desviación de estándar(?) y el coeficiente de variación (C.V.) para cada uno de estos sueros del control se presentan en la tabla 2 y la tabla 3.

Muestra	N	X	$\sigma$	C.V.
Nivel 1	20	2.8	0.15	5.4%
Nivel 2	20	15.2	0.65	4.2%
Nivel 3	20	178.0	10.50	5.9%

Muestra	N	X	$\sigma$	C.V.
Nivel 1	10	3.1	0.17	5.5%
Nivel 2	10	15.4	0.81	5.3%
Nivel 3	10	185.6	11.10	6.0%

\*Como medidos en 10 experimentos en duplicado por 7 días.

## B. Exactitud

El procedimiento de hCG por micro plato de ELISA fue comparado con un método de referencia de radioinmunoanálisis. Especímenes biológicos de poblaciones normales y embarazos fueron analizados. El número total de estos especímenes fue de 110. La ecuación de regresión del último cuadro y la correlación del coeficiente fueron computados por la ELISA hCG en comparación con el método de referencia. La información obtenida se muestra a continuación.

Método	Sign. (X)	Regresión Analisis	Correlación Coeficiente
Este método	14.8	$y=0.081+0.93(x)$	0.989
Referencia	15.1		

Solo una pequeña cantidad de la referencia de diagonal entre este método de ELISA hCG y el método de referencia es indicada por la proximidad de los valores medios. La ecuación de la regresión de la última tabla y el coeficiente de correlación indica el acuerdo excelente del método.

## C. Sensibilidad

El procedimiento del hCG tiene una sensibilidad de 0.02 mIU. Esta es equivalente a una muestra que contiene una concentración de hCG de 0.8 mIU/ml.

D. Especificidad: El método de reactividad cruzada del hCG para seleccionar sustancias fue evaluada agregando la sustancia que interfiere a una matriz del suero en las varias concentraciones. La reactividad cruzada fue calculada derivando un cociente entre la dosis de la sustancia que interfiere a la dosis de la Gonadotropina coriónica necesaria para desplazar el mismo trazo de la absorbancia.

Sustancia	React Cruzada	Concentración
Gonadotropina Corionica a(hCG)	1.0000	----
$\beta$ -hCG subunidad	<0.0001	1000ng/ml
Folitropina (FSH)	<0.0001	1000ng/ml
Lutropina (LH)	< 0.0001	1000ng/ml
Tirotropina (TSH)	< 0.0001	1000ng/ml

## REFERENCIAS

1. Kosasa T.S., "Measurement of Human Luteinizing Hormone", *Journal of Reproductive Medicine*, **26**, 201-6 (1981).
2. Danzer H, Braunstein GD, et al. "Maternal Serum Human Chorionic Gonadotropin Concentrations and Fetal Sex Predictions", *Fertility and Sterility*, **34**, 336-40 (1980).
3. Braunstein GD, et al. "Serum Human Luteinizing Hormone Levels through Normal Pregnancy", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **126**, 678-81 (1976).
4. Goldstein DP, and Kosasa T, "The Subunit Radioimmunoassay for LH Clinical Application", *Gynecology*, **6**, 45-84 (1975).
5. Batzer F, "Hormonal Evaluation of Early Pregnancy", *Fertility and Sterility*, **34**, 1-12 (1980).
6. Braunstein, G.D., et al., "First-Trimester Luteinizing Hormone Measurements as an Aid to the Diagnosis of Early Pregnancy Disorders", *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **131**, 25-32 (1978).
7. Lenton E, Neal L and Sulaiman R, "Plasma Concentrations of Human Gonadotropin from the time of Implantation until the Second Week of Pregnancy", *Fertility and Sterility*, **37**, 773-78 (1982).

