

For the Quantitative Measurement of **hCG** in Human Serum and EDTA or Li-Heparin Plasma

**CAUTION: United States Federal law restricts this device to sale and distribution by or on the order of a physician, or to a clinical laboratory; and use is restricted to, by or on the order of a physician.**

#### INTENDED USE

The FastPack® IP and FastPack® hCG Immunoassay is a paramagnetic particle immunoassay for the *in-vitro* quantitative determination of hCG in human serum or EDTA or lithium-heparin plasma. The FastPack® IP and FastPack® hCG Immunoassay is designed for use with the FastPack® IP System and is indicated for the early detection of pregnancy.

#### SUMMARY

Human chorionic gonadotropin (hCG) is an oligosaccharide glycoprotein hormone produced by the placenta. It is a heterodimeric protein with an alpha subunit chain of 92 amino acids in length with a molecular weight of 15,000-20,000 Daltons and a beta subunit chain of 152 amino acids in length with a molecular weight of 25,000-30,000 Daltons. The amino acid sequence of the alpha subunit is identical to three hormones produced by the pituitary gland: luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH), and thyroid stimulating hormone (TSH). However, the amino acid sequence of the beta subunit of hCG is unique, as are the beta subunits of LH, FSH, and TSH, and thus confers immunological specificity to assays developed to measure the four hormones.

Shortly after implantation of a fertilized ovum into the uterine wall, the trophoblast begins to produce hCG and continues to do so until the placenta is capable of production and secretion of hCG<sup>1</sup>. During these initial stages of pregnancy, hCG promotes the maintenance of the corpus luteum by stimulation of progesterone secretion. During a normal pregnancy, hCG measured in serum varies in concentration but may be as high as 50 mIU/mL in the week following conception, and doubles every 1.5-3 days for the subsequent six weeks<sup>2</sup>. Serum hCG concentrations continue to rise until the end of the first trimester, after which concentrations diminish for the remainder of the gestation period. Following delivery, hCG concentrations in serum rapidly return to pre-pregnancy levels.

Due to the very rapid rise in hCG production in the first trimester, hCG has been historically measured as an indicator of pregnancy in humans. The elevation of hCG levels is quite specific for pregnancy as healthy, non-pregnant individuals have low to undetectable concentrations of hCG in serum. In a confirmed pregnancy, unusually low levels of hCG may also result from other conditions such as ectopic pregnancy or impending spontaneous abortions<sup>3</sup>.

hCG was originally measured by correlation to gonadal tissue response in various animals. Later, tests to measure hCG in human urine collections were developed, typically employing latex agglutination methodologies. Radioimmunoassay (RIA) techniques based on competitive inhibition methods utilizing polyclonal antibodies were developed in the early 1970's and were shown to be sensitive for measurements of hCG in serum and urine<sup>4</sup>. Subsequently, two-site immunoradiometric (IRMA) assays employing dual monoclonal antibodies specific for hCG were developed and provided a platform for measurement of hCG with increased sensitivity, specificity, and precision<sup>5</sup>.

#### TEST PRINCIPLE

The FastPack® IP and FastPack® hCG Immunoassay is a chemiluminescence assay based on the "sandwich" principle.

- Primary incubation: A monoclonal anti-hCG antibody labeled with alkaline phosphatase [100 µL] reacts with hCG from the patient's sample, control or calibrator [25 µL].
- Secondary incubation: A second monoclonal anti-hCG antibody covalently coupled to biotin and pre-bound to streptavidin-coated paramagnetic particles [150 µL] is combined with the reaction mixture.
- Removal of unbound materials: The paramagnetic particles are repeatedly washed with wash buffer [0.2 mL/wash] to remove unbound materials.
- Substrate addition and detection: Chemiluminogenic substrate [140 µL] is added to the solid-phase bound complex and results in "glow" chemiluminescence, which is measured using the FastPack® IP System.
- The amount of bound labeled-antibody is directly proportional to the concentration of hCG in the sample.

## REAGENTS – Content and Concentration

Each FastPack<sup>®</sup> IP carton contains:

- 30 FastPack<sup>®</sup> IPs

Each FastPack<sup>®</sup> carton contains:

- 50 FastPacks

Each FastPack<sup>®</sup> IP or FastPack<sup>®</sup> Contains:

- Paramagnetic Particles, 150  $\mu$ L  
Biotin-mouse monoclonal anti- $\beta$ hCG antibody bound to streptavidin-coated paramagnetic particles in buffer containing <0.1% sodium azide and 0.1% ProClin<sup>®</sup> 300 as a preservative.
- hCG Antibody Solution 1, 100  $\mu$ L  
Antibody solution containing a mouse monoclonal anti- $\beta$ hCG antibody labeled with alkaline phosphatase in a protein matrix containing <0.1% sodium azide and 0.1% ProClin<sup>®</sup> 300 as a preservative.
- Wash Buffer, 2.0 mL  
Tris buffer containing surfactants.
- Substrate, 140  $\mu$ L  
ImmuGlow<sup>™</sup> Plus: Indoxyl-3-phosphate and lucigenin in buffer containing preservatives.

Materials required but not provided

- FastPack<sup>®</sup> IP System
- FastPack<sup>®</sup> hCG Calibrator Kit – Cat. No. 25000035
- FastPack<sup>®</sup> hCG Sample Diluent – Cat. No. 25000036
- Quality control materials (see “Quality Control” section)

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For *in-vitro* diagnostic use only.
- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink or smoke in designated work areas.
- Wash hands thoroughly after handling specimen.
- HAMA Interference: some individuals have antibodies to mouse protein (HAMA), which can cause interference in immunoassays that employ antibodies derived from mice<sup>6</sup>.
- FastPack<sup>®</sup> IP and FastPack<sup>®</sup> reagents are stable until the expiration date on the label when stored and handled as directed. Do not use FastPack<sup>®</sup> IP and FastPack<sup>®</sup> reagents beyond the expiration date.
- Discard used FastPacks into a Biohazard container.
- ProClin<sup>®</sup> 300 is an irritant. The following are appropriate Risk (R) and Safety (S) phrases for ProClin<sup>®</sup> 300:

R43 May cause sensitization by skin contact

S28-37 After contact with skin, wash immediately with plenty of soap and water. Wear suitable gloves.

- The components containing sodium azide are classified per applicable European Economic Community (EEC) Directives as: Very toxic and dangerous to the environment (T+ N). The following are appropriate Risk (R) and Safety (S) phrases for sodium azide:

R28 Very toxic if swallowed.

R32 Contact with acids liberates very toxic gas.

R50/53 Very toxic to aquatic organisms. May cause long-term adverse effects in the aquatic environment.

S28 After contact with skin, wash immediately with plenty of soap-suds.

S45 In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

S60 This material and its container must be disposed of as hazardous waste.

S61 Avoid release to the environment. Refer to special instructions/safety data sheets.

## STORAGE INSTRUCTIONS

Store at 2 – 8 °C.

## SPECIMEN COLLECTION/PREPARATION

1. Serum, EDTA or lithium-heparin plasma samples can be used for the FastPack<sup>®</sup> IP and FastPack<sup>®</sup> hCG Immunoassay.
2. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) provides the following recommendations for handling, processing and storing blood.<sup>7,8</sup>
  - A. Collect all blood samples observing routine precautions for venipuncture.
  - B. For plasma samples:
    - Collect samples in an EDTA (lavender top) or heparinized (green top) tube.
    - Mix the tube immediately after collection by gently inverting it several times.
    - Plasma should be separated from the cells by centrifugation within 3 hours from time of collection and stored at 2–8° C. Transfer the plasma from the original tube for storage.
    - If not tested within 24 hours, the sample should be frozen at –20° C or colder.

- C Samples should be free of red blood cells, or other particulate material for optimal results.
- D Samples showing turbidity and particulate matter should be centrifuged prior to use.
- E Ensure the samples are free of bubbles.

## ASSAY PROCEDURE

See the FastPack® IP System Procedure Manual for detailed instructions for running FastPack® IP assays.

## INSTRUMENTATION

FastPack® IP System

## DETAILS OF CALIBRATION

During the FastPack® IP and FastPack® production process, Qualigen generates a master standard curve and places this information in the barcode of each FastPack® IP FastPack® label, where it can be read by the FastPack® IP System analyzer during the testing sequence. The FastPack® IP System analyzer must be calibrated by the end user so that it is properly adjusted for the particular lot of FastPacks that are being used. Separate calibrations must be run for each type of test, i.e. Total PSA, Testosterone, or hCG. The frequency of calibration varies for each test type. For the FastPack® IP and FastPack® hCG Immunoassays, the FastPack® IP System analyzer must be calibrated once every 30 days or whenever a new lot of hCG FastPacks is to be used.

Whenever the user performs a calibration for a particular lot of FastPacks or uses a new lot of calibrator, 2 FastPacks must be run for calibration (duplicates). When the calibration expires (30 days after initial calibration) 2 FastPacks must be run for calibration. See FastPack® IP System Procedure Manual for "Running a Calibration".

Use FastPack® hCG Calibrator Kit – Cat. No. 25000035

## RESULTS

The FastPack® IP System analyzer uses the information from the barcode to construct a lookup table of x,y values that represent the standard curve and estimates the concentration of unknown samples by linear interpolation.

## QUALITY CONTROL

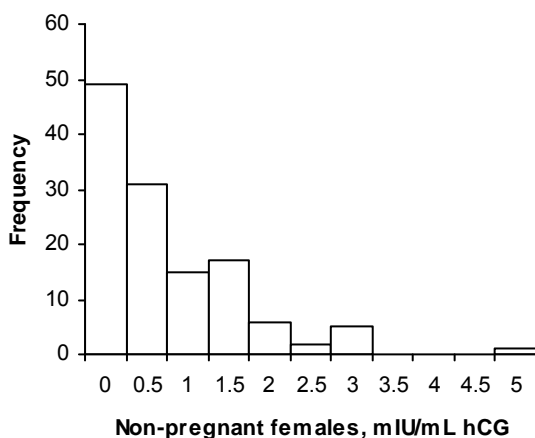
Quality control materials are essential for monitoring the system performance of assays. Good Laboratory Practices (GLP) include the use of control specimens to ensure that all reagents and protocols are performing properly. See FastPack® IP System Procedure Manual for "Control Testing". At least two levels of quality control materials should be used with hCG concentrations at or near medical decision levels. Please contact Qualigen Customer Service for recommendations of quality control materials. Users should also follow the appropriate federal, state and local guidelines concerning the running of external quality controls.

## LIMITATIONS OF PROCEDURE

- Plasma samples to be collected using EDTA or lithium-heparin as the anticoagulants.
- Specimens can be detected within the reportable range of the limit of detection (1.8 mIU/mL hCG) and the upper end of the calibration range, 1000 mIU/mL and reliably measured at concentrations at and above the LOQ (3.1 mIU/mL). Values below the LOD should be reported as "<1.8 mIU/mL hCG" and values above the range should be reported as ">1000 mIU/mL hCG" if not diluted and re-tested.
- Samples >1000 mIU/mL should be reported as such or re-run using another method. Samples may be diluted using the hCG sample diluent until within range of the assay.
- FastPack® IP and FastPack® hCG Immunoassay does not show a high-dose hook effect up to 500,000 mIU/mL.
- Specimen 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 employing mouse monoclonal antibodies.
- Heterophilic antibodies in a sample have the potential to cause interference in immunoassay systems. Infrequently, hCG levels may appear depressed due to heterophilic antibodies present in the patient's sample or to nonspecific protein binding. If the hCG level is inconsistent with clinical evidence, additional hCG testing is suggested to confirm the result.
- For diagnostic purposes, the FastPack® IP and FastPack® hCG Immunoassay should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination and other findings.
- The hCG assay has not been evaluated in Point of Care settings.
- The concentration of Human Chorionic Gonadotropin (hCG) in a given specimen determined with assays from different manufacturers can vary due to differences in assay methods and reagent specificity. The results reported by the laboratory to the physician must include the identity of the hCG assay method used. Values obtained with different assay methods should not be used interchangeably.

## EXPECTED VALUES/REFERENCE INTERVALS

Samples were obtained from 241 individuals, 115 males and 126 non-pregnant females. Samples were obtained from apparently healthy blood donors without any clinically abnormal indications. hCG levels were determined using the FastPack<sup>®</sup> IP and FastPack<sup>®</sup> hCG Immunoassay in conjunction with the FastPack<sup>®</sup> IP System in order to establish the hCG concentrations in the reference populations. The reference interval (5<sup>th</sup> to 95<sup>th</sup> percentiles) for the FastPack<sup>®</sup> IP and FastPack<sup>®</sup> hCG Immunoassay for males is <1.8 mIU/mL and <1.8 – 3.0 mIU/mL for non-pregnant females. These reference intervals reflect the donor population of this study group. Each laboratory should determine their own reference intervals appropriate for their population. The distribution of values for non-pregnant females is presented in the histogram below.



## SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Precision

Three control serum pools spiked with varying amounts of hCG were assayed using two lots of FastPack<sup>®</sup> IP and FastPack<sup>®</sup> hCG reagents and three FastPack<sup>®</sup> IP instruments. Each control was tested in duplicate determinations per day over a period of 10 days for a total of 20 replicate determinations per control. The data was analyzed using the analysis of variance (ANOVA) technique and within-assay and total imprecision were determined. Mean, standard deviation (SD), and percent coefficient of variation (%CV) were calculated for each control solution.

#### Within-Assay Imprecision

	Control 1	Control 2	Control 3	Control 4
Mean mIU/mL hCG	3.4	19.0	347.3	722.3
SD	0.37	1.8	21.5	73.7
%CV	10.8	9.4	6.2	10.2

#### Total Imprecision

	Control 1	Control 2	Control 3	Control 4
Mean mIU/mL hCG	3.4	19.0	347.3	722.3
SD	0.50	2.2	27.1	98.3
%CV	14.5	11.4	7.8	13.6

### Range of linearity

For hCG as tested by the FastPack<sup>®</sup> IP and FastPack<sup>®</sup> hCG assay, based on the CLSI EP-6A evaluation the method has been demonstrated to be linear from 1.8 mIU/mL to 940.6 mIU/mL within 5 mIU/mL in the interval between 1.8 and 50 mIU/mL and 25 mIU/mL in the interval between 50 and 1000 mIU/mL hCG.

### Linearity Upon Dilution

Two serum pools with high endogenous concentrations of hCG were diluted 1:2, 1:4, 1:8, and 1:16 with a protein-based Tris buffer diluent and quantified in triplicate determinations with one lot of FastPack® IP and FastPack® hCG reagents on a single FastPack® IP instrument. Measured values of the dilutions were compared to their expected values (determined in the same assay) based on the measured value of the Neat sample and the respective dilution factors. (% Recovery = [Observed value/Expected Value] X 100).

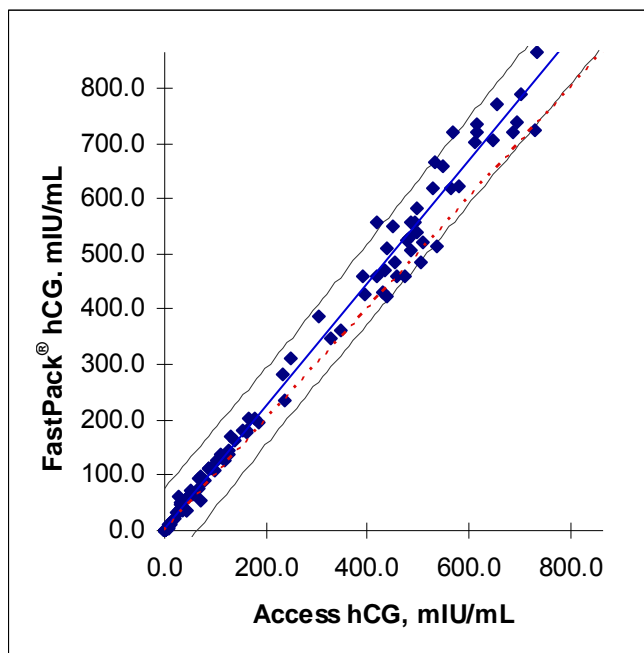
Serum Pool 1	Expected (mIU/mL)	Measured (mIU/mL)	% Recovery
Neat	N/A	699.2	N/A
1:2	349.6	366.6	104.9
1:4	174.8	174.7	99.9
1:8	87.4	90.1	103.1
1:16	43.7	46.5	106.4

Serum Pool 2	Expected (mIU/mL)	Measured (mIU/mL)	% Recovery
Neat	N/A	443.1	N/A
1:2	221.5	205.5	92.7
1:4	110.8	105.3	95.0
1:8	55.4	59.2	107.0
1:16	27.7	28.7	103.7

### Method Comparison

Clinical serum samples (n=106) were used to compare the values obtained using the FastPack® IP and FastPack® hCG method and the values obtained using the Beckman-Coulter Access® hCG method. The values were evaluated for agreement using Deming regression analysis, with the associated correlation coefficient.

n	Range of Observation (mIU/mL)	Intercept (mIU/mL)	Slope	R <sup>2</sup>
106	0.0 – 864.6	2.44	1.11	0.99



## INTERFERING SUBSTANCES

The effect of icteric, lipemic, and hemolyzed serum samples and serum samples with high protein content on quantification of hCG was investigated by spiking of one serum pool with endogenous hCG concentration of ~300 mIU/mL with known concentrations of bilirubin, triglycerides, hemoglobin, and human serum albumin and another serum pool with endogenous hCG concentration of ~3 mIU/mL with the same concentrations of the interfering substances. The values obtained for the serum pools with each interfering substance were compared to the values obtained for the serum pools without the interfering substance and the percentage bias or absolute bias in mIU/mL determined. These compounds did not show interference at the levels indicated.

	Interfering Substance			
	Bilirubin (30 mg/dL)	Lipemia (1800 mg/dL)	Hemoglobin (500 mg/dL)	Human Albumin (3 g/dL)
Non-spiked aliquot	303.4 mIU/mL	274.6 mIU/mL	260.6 mIU/mL	255.0 mIU/mL
Spiked aliquot	318.0 mIU/mL	288.9 mIU/mL	265.9 mIU/mL	260.6 mIU/mL
% Bias	+4.8%	+5.2%	+5.3%	+2.2%

	Interfering Substance			
	Bilirubin (30 mg/dL)	Lipemia (1800 mg/dL)	Hemoglobin (500 mg/dL)	Human Albumin (3 g/dL)
Non-spiked aliquot	3.8 mIU/mL	3.3 mIU/mL	2.3 mIU/mL	4.3 mIU/mL
Spiked aliquot	4.2 mIU/mL	3.7 mIU/mL	1.9 mIU/mL	4.4 mIU/mL
Absolute bias	0.4	0.4	-0.4	0.1

### Cross-reactivity

No significant cross reactivity (<0.5 mIU/mL) was obtained when FastPack® hCG sample diluent was spiked with the following cross-reactants: LH, at 1000 mIU/mL, FSH at 1000 mIU/mL and TSH at 1000 µIU/mL. The molar percent specificity when 25 mIU/mL of WHO 75/551 free βhCG subunit is added to FastPack® hCG sample diluent is approximately 110%.

### Limit of Blank (LOB), Limit of Detection (LOD), and Limit of Quantitation (LOQ)

The limit of blank (LOB, the highest measurement likely to be observed for a blank sample), limit of detection (LOD, the lowest amount of analyte in a sample that can be detected with type I and II error rates set to 5%), and limit of quantitation (LOQ, the lowest amount of analyte in a sample that can be reliably detected and at which the total error meets the pre-specified requirement for accuracy) were determined according to CLSI EP17-A for the FastPack® IP and FastPack® hCG assay. In this study, the limit of blank was determined from 10 replicate determinations of the FastPack® hCG sample diluent on each of three different FastPack® IP instruments using two different lots of reagent sets. Raw RLUs from the assays were converted to apparent mIU/mL based on the calibration curve for each assay. The LOB was determined as the maximum observed value. This value was 0.8 mIU/mL hCG.

The LOD was estimated from 80 replicate determinations of a low control sample. Per the CLSI EP17-A guideline, LOD was determined by the following equation:

$$\text{LOD} = \text{LOB} + (c_{\beta} * \text{SD}_S),$$

Where  $c_{\beta} = 1.645/(1-(1/(4 * f)))$ , where  $f$  is the degrees of freedom, and  $\text{SD}_S$  is the standard deviation of the observations. In this study, the LOD was found to be 1.8 mIU/mL hCG.

For the LOQ analyses, the prospectively defined goals for accuracy were 80-120% recovery and <20% CV. In this study, a control sample recovering at 3.1 mIU/mL hCG was shown to meet these criteria for recovery and CV (93.8% and 18.7%, respectively), thus the LOQ was found to be 3.1 mIU/mL hCG.

## REFERENCES

- <sup>1</sup> Kardana A, et al. The heterogeneity of hCG. *Endocrinology* 1991; 129: 1541-1567.
- <sup>2</sup> Vaitukaitis JL. Recent progress in hormone research 1976; 32: 289.
- <sup>3</sup> Sokolove PJ, Faix JD. Agreement of intact and beta chain-specific HCG assays in abnormal pregnancy. *Journal of Clinical Immunoassay*, Fall, 1991; 14, No. 3: 196-199.
- <sup>4</sup> Vaitukaitis JL, Braunstein GD, Ross GT. A radioimmunoassay which specifically measures human chorionic gonadotropin in the presence of human luteinizing hormone. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1972; 113: 751-758.
- <sup>5</sup> Norman RJ, Buck RH, Joubert SM. Comparison of human chorionic gonadotrophin concentrations in the sera of patients with normal and abnormal pregnancy measured by radioimmunoassay and immunoradiometric assay. *South African Medical Journal* April, 1989; 75: 318-319.
- <sup>6</sup> Schroff, RJ, Foon, KA, *et.al.* Human anti-mouse immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Res*, 45:879 – 885, 1985
- <sup>7</sup> Approved Standard – procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. 5<sup>th</sup> Edition: H3-A5: 23(32), 2003, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
- <sup>8</sup> Approved guideline – procedures for the handling and processing of blood specimens, H18-A2; 19(21), 1999. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).



Qualigen, Inc.  
Carlsbad, CA 92011 USA  
Technical Support  
(760) 918-9165  
(877) 709-2169



MDSS  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover  
Germany



Zur quantitativen Bestimmung des hCG aus menschlichem Serum, EDTA oder Li-Heparin Plasma

**VORSICHT: Der Verkauf dieses Artikels ist gesetzlich nur an Ärzte oder im Auftrag eines Arztes bzw. nur an klinische Labors zugelassen. Der Gebrauch ist nur durch einen Arzt oder im Auftrag eines Arztes zulässig.**

### VERWENDUNGSZWECK

Der FastPack® IP und FastPack® hCG Immunoassay ist ein paramagnetischer Partikel Immunoassay für die quantitative *in-vitro Bestimmung* des hCG aus menschlichem Serum oder EDTA oder Lithium-Heparin Plasma. Der FastPack® IP und FastPack® hCG Immunoassay ist für den Gebrauch mit dem FastPack® IP System und zur frühzeitigen Bestimmung von Schwangerschaften entwickelt worden.

### ÜBERSICHT

Humanes Chorion-Gonadotropin (hCG) ist ein Oligosaccharides Glycoprotein Hormon, dass von der Plazenta produziert wird. Es ist ein heterodimerisches Protein mit einer Alpha-Unterkette bestehend aus 92 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 15,000-20,000 Daltons und einer Beta-Unterkette bestehend aus 152 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 25,000-30,000 Daltons. Die Aminosäuresequenz der Alpha-Unterkette ist mit 3 Hormonen, die die Hirnanhangdrüse produziert identisch. Dem luteinisierenden Hormon (LH) dem follikelstimulierenden Hormon (FSH) und dem thyroideastimulierenden Hormon (TSH). Die Aminosäuresequenz der Beta-Unterkette des hCG ist jedoch einzigartig, wie auch die Beta-Unterketten von LH, FSH und TSH. Die daraus resultierende immunologische Spezifität machen sich Assays zur Bestimmung dieser 4 Hormone zu Nutze.

Kurz nach der Einnistung einer befruchteten Eizelle in die Gebärmutterhöhle beginnt der Trophoblast mit der Produktion von hCG, bis die Plazenta selbst in der Lage ist hCG<sup>1</sup> zu produzieren und auszuschütten. Während der ersten Schwangerschaftsphase unterstützt hCG den Erhalt der Gelbkörper durch Stimulation der Progesteronsekretion. Bei einer normalen Schwangerschaft variiert die aus Serum gemessene hCG Konzentration, kann jedoch schon 50 mIU/mL in der ersten Woche nach Konzeption erreichen. Danach verdoppeln sich die Werte alle 1,5 – 3 Tage für die nächsten 6 Wochen<sup>2</sup>. Serum hCG Konzentrationen steigen bis zum Ende des ersten Trimesters an um sich danach für den Rest der Gestationszeit wieder abzuschwächen. Nach der Geburt pendeln sich die Serum hCG Konzentrationen wieder rasch auf das Vorschwangerschaftsniveau ein.

Wegen des sehr starken Ansteigens der hCG Produktion im ersten Schwangerschaftstrimester wurde hCG historisch als Schwangerschaftsindikator herangezogen. Die Erhöhung der hCG Werte ist sehr spezifisch, da gesunde, nicht schwangere, sehr niedrige bis undetektierbare hCG Werte im Serum haben. Bei bestätigten Schwangerschaften sind niedrige hCG Werte auf besondere Umstände zurück zu führen, wie zum Beispiel bei ektopischer Schwangerschaft oder drohendem Spontanabort<sup>3</sup>.

hCG wurde ursprünglich durch Korrelation zur Reaktion des Gonadengewebes in verschiedenen Tieren gemessen. Später wurden dann hCG Tests für menschliches Urin entwickelt, die, typischerweise auf der Latexagglutinationsmethodik beruhen. Radioimmunoassay (RIA) Techniken, die auf der kompetitiven Inhibitionsmethode basieren und polyklonale Antikörper verwenden wurden in den frühen 70iger Jahren entwickelt und zeigten sich sensitiv zur Messung des hCG in Serum und Urin<sup>4</sup>. Anschließend wurden zweiseitige Immunoradiometrische (IRMA) Assays entwickelt, die 2 spezifisch auf hCG gerichtete monoklonale Antikörper verwenden. Diese Plattform sorgte für verbesserte Sensitivität, Spezifität und Präzision<sup>5</sup>.

### TESTPRINZIP

Der FastPack® IP und FastPack® hCG Immunoassay ist ein Chemilumineszenzassay, der auf dem "Sandwich" Prinzip aufbaut.

- Primäre Inkubation: Ein monoklonaler Anti-hCG Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase markiert ist [100 µL] reagiert mit dem hCG der Patientenprobe, der Kontrolle oder dem Kalibrator [25 µL].
- Sekundäre Inkubation: Ein zweiter monoklonaler Anti-hCG Antikörper kovalent gebunden an Biotin der seinerseits an streptavidinbeschichtete, paramagnetische Partikel gebunden ist, wird in die Reaktionsmischung gegeben [150 µL].
- Beseitigung des ungebundenen Materials: Die paramagnetischen Partikel werden wiederholt mit Waschpuffer [0.2 mL/Waschvorgang] gewaschen.
- Zugabe des Substrat und Detektion: Chemilumineszierendes Substrat [140 µL] wird dem, an die feste Phase gebundenen Komplex zugegeben und resultiert in chemilumineszierendem „Licht“, das vom FastPack® IP Analysegerät gemessen wird.
- Die Menge des gebundenen, markierten Antikörper ist zur Konzentration des Freien hCG in der Probe direkt proportional



## REAGENZIEN – Inhalt und Konzentrationen

Jeder FastPack® IP-Karton enthält:

- 30 FastPacks

Jeder FastPack®-Karton enthält:

- 50 FastPacks

Jeder FastPack® IP oder FastPack® enthält:

- Paramagnetische Partikel, 150 µL  
Biotin-Maus monoklonale Anti-βhCG Antikörper, die an streptavidinbeschichtete, paramagnetische Partikel gebunden sind, in Puffer mit < 0,1% Natriumazid und 0,1% ProClin® 300 als Konservierungsmittel.
- hCG Antikörper Lösung 1, 100 µL  
Die Antikörperlösung enthält monoklonale Maus Anti-βhCG Antikörper, die mit alkalischer Phosphatase markiert in einer Proteinematrix sind, und <0,1% Natriumazid und 0,1% ProClin® 300 als Konservierungsmittel enthält
- Wasch Puffer, 2.0 mL  
Oberflächenaktive Substanzen mit Tris-Puffer.
- Substrat, 140 µL  
ImmuGlow™: Indoxyl-3-Phosphat und Lucigenin in Puffer, der Konservierungsmittel enthält.

Notwendige Materialien die nicht enthalten sind

- FastPack® IP System
- FastPack® hCG Kalibrator Kit – Cat. No. 25000035
- FastPack® hCG Probenverdünnung – Cat. No. 25000036
- Qualitätskontrollmaterialien (siehe Sektion “Qualitätskontrolle”)

## WARNUNGEN UND SICHERHEITSHINWEISE

- Nur zur *In-vitro*-Diagnostik.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- In den betreffenden Arbeitszonen weder essen, trinken noch rauchen.
- Hände nach dem Umgang mit Proben gründlich waschen.
- HAMA-Interferenz: Einige Personen besitzen Antikörper gegen Mausproteine (HAMA), was zu Interferenz in Immunoassays führen kann, die von Mäusen gewonnene Antikörper verwenden<sup>6</sup>.
- Bei vorgeschriebener Lagerung und Handhabung sind FastPack® IP und FastPack® Reagenzien bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil. FastPack® IP und FastPack® Reagenzien dürfen nicht über das Verfallsdatum hinaus verwendet werden.
- Die gebrauchten FastPack® IP und FastPack® in einem Sonderbehälter für Bioabfall entsorgen.
- ProClin® 300 ist ein Reizmittel. Dabei kommen folgende Risiko- (R) und Sicherheitsbestimmungen (S) zur Anwendung:

R43 Kann bei Hautkontakt zu allergischen Reaktionen führen  
S28-37 Nach Hautkontakt umgehend mit viel Seife und Wasser waschen. Schutzhandschuhe tragen.

- Bestandteile, welche Natriumazid enthalten, sind gemäß einschlägiger Richtlinie der Europäischen Gemeinschaft (EC) als: sehr toxisch und gefährlich für die Umwelt (T+ N) eingeschätzt. Dabei kommen folgende Risiko- (R) und Sicherheitsbestimmungen (S) zur Anwendung:

R28 Sehr giftig beim Verschlucken.  
R32 Kontakt mit Säuren führt zu stark toxischer Gasfreigabe.  
R50/53 Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.  
S28 Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Seifenlauge abwaschen (vom Hersteller anzugeben).  
S45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).  
S60 Dieses Produkt und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen.  
S61 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen

## LAGERUNGSHINWEISE

Bei 2 – 8 °C lagern.

## PROBENENTNAHME UND-VORBEREITUNG

1. Serum, EDTA oder Lithium-Heparin Plasma Proben können mit dem FastPack® IP und FastPack® hCG Immunoassay verwendet werden.
2. Das National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) gibt Empfehlungen für die Handhabung, Aufbereitung und Lagerung von Blut<sup>7,8</sup>.
  - A. Bei der Entnahme von Blutproben sind die üblichen Vorsichtsmaßnahmen bei der Venenpunktion zu beachten.
  - B. Für Plasmaproben:
    - Entnehmen der Probe in ein EDTA (lila Kappe) oder ein heparinisierendes (grüne Kappe) Probenröhrchen.
    - Unmittelbar nach Entnahme die Probe durch vorsichtiges, mehrmaliges schwenken mischen.

- Das Plasma innerhalb von 3 Stunden nach Entnahme trennen und zentrifugieren und bei 2-8° C lagern. Das Plasma aus dem ursprünglichen Probenröhrchen transferieren.
- Proben, die nicht innerhalb von 24 Stunden analysiert werden, müssen bei mindestens –20 °C eingefroren werden.

C. Für optimale Resultate müssen die Proben frei von roten Blutzellen oder anderer Partikel sein.

D. Proben die trüb sind und Partikel aufweisen müssen vor Verwendung zentrifugiert werden.

E. Stellen sie sicher, dass die Proben blasenfrei sind.

## ASSAYVERFAHREN

Zum Gebrauch siehe das FastPack® IP System Bedienungshandbuch.

## ANALYSEGERÄT

FastPack® IP System

## EINZELHEITEN ZUR KALIBRIERUNG

Während des FastPack® IP und FastPack®-Produktionsprozesses generiert Qualigen eine Standardkurve und schreibt diese Informationen in den Barcode jedes FastPack® IP und FastPack® Etiketts, aus dem sie vom FastPack® IP Analyzer während der Testsequenz gelesen werden können. Das FastPack® IP Analyzegerät muss vom Benutzer kalibriert werden, um sicherzustellen, dass er für die verwendete Charge von FastPacks ordnungsgemäß justiert ist. Für jeden Testtyp, z. B. Gesamt-PSA, Testosteron oder hCG, müssen separate Kalibrierungen vorgenommen werden. Die Kalibrierungshäufigkeit ist für jeden Testtyp verschieden. Für den FastPack® IP und FastPack® hCG-Immunoassay muss das FastPack® IP Instrument alle 30 Tage oder vor Gebrauch einer neuen Charge von hCG FastPack® IPs kalibriert werden.

Jedes Mal, wenn der Benutzer eine Anfangskalibration für eine bestimmte FastPack® IP und FastPack®-Charge vornimmt oder eine neue Kalibrator-Charge benutzt, müssen zur Kalibrierung 2 FastPacks (Duplikate) analysiert werden. Wird eine Neukalibrierung mit der gleichen Charge von FastPacks und Kalibrator vorgenommen, sind zwei FastPacks erforderlich. Siehe hierzu „Kalibrierung“ im Bedienungshandbuch des FastPack® IP Systems.

Zur Kalibrierung dient das FastPack® hCG Calibrator Kit – Cat. No. 25000035

## ERGEBNISSE

Der FastPack® IP Analyzegerät verwendet die Informationen vom Barcode zum Aufbau einer Suchtabelle von x-y-Werten, welche die Standardkurve darstellen, aus der die Konzentration unbekannter Proben durch lineare Interpolation bestimmt werden.

## QUALITÄTSKONTROLLE

Qualitätskontrollmaterialien sind wesentlich um die Leistungsfähigkeit von Assays zu dokumentieren. Good Laboratory Practices (GLP, Gute Laborpraxis) beinhaltet den Gebrauch von Kontrollproben um sicher zu stellen, dass alle Reagenzien und Protokolle einwandfrei funktionieren. Siehe dazu auch das FastPack® IP System Bedienungshandbuch. Mindestens 2 verschiedene Konzentrationen von Kontrollen, die im oder nahe des medizinisch relevanten Bereichs liegen, sollen mit dem hCG verwendet werden. Bitte wenden Sie sich an den Qualigen Kundendienst für Empfehlungen der Kontrollmaterialien. Die Benutzer sollen auch die anzuwendenden landesspezifischen und lokalen Richtlinien zum Gebrauch von externen Qualitätskontrollen berücksichtigen.

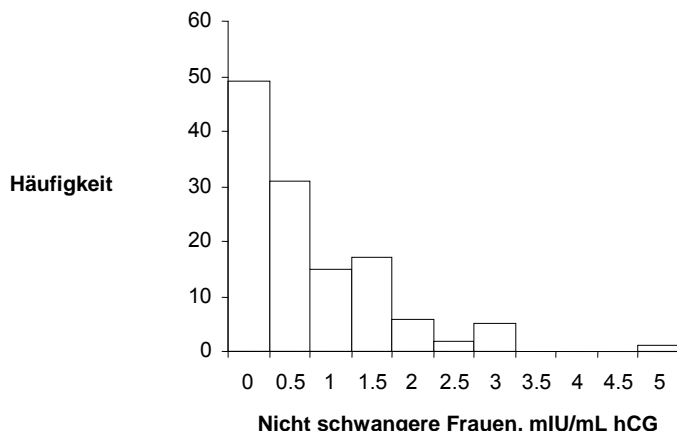
## GRENZEN DES VERFAHRENS

- Plasmaproben die EDTA oder Lithium-Heparin als Antikoagulanzen verwenden.
- Proben können innerhalb des messbaren Bereichs, von der Detektionsuntergrenze (1.8 mIU/mL hCG) bis zum Ende des Kalibrationsbereichs 1000 mIU/mL detektiert werden. Verlässliche Messungen ergeben sich bei Konzentrationen die größer oder gleich dem LOQ (3.1 mIU/mL) sind. Werte unterhalb des LOD sollten als “<1.8 mIU/mL hCG” ausgegeben werden. Werte oberhalb des Messbereichs als “>1000 mIU/mL hCG”, falls sie nicht verdünnt nochmals getestet wurden.
- Proben >1000 mIU/mL sollten auch so ausgegeben oder nochmals, mit einer anderen Methode, getestet werden. Proben können auch mittels hCG Verdünnungslösung solange verdünnt werden bis die Ergebnisse im Messbereich liegen.
- Der FastPack® IP und FastPack® hCG Immunoassay zeigt keinen High-Dose Hook Effekt bis zu einem Wert von 500,000 mIU/mL.
- Proben von Patienten, welche aus diagnostischen oder therapeutischen Gründen Präparate aus monoklonalen Antikörpern von Mäusen erhalten haben, enthalten eventuell menschliche Anti-Maus-Antikörper (HAMA). Durch Analyse mit Assay-Kits, die monoklonale Mäuse-Antikörper von Mäusen verwenden, können diese Proben fälschlicherweise erhöhte oder verringerte Werte aufweisen.
- Heterophile Antikörper in Proben können eventuell zu Interferenzen in Immunoassaysystemen führen. In seltenen Fällen können erniedrigte hCG-Werte aufgrund von heterophilen Antikörpern in der Patientenprobe oder infolge unspezifischer Proteinbindung, auftreten. Steht der hCG-Wert im Widerspruch zur klinischen Beurteilung, werden zur Bestätigung der Ergebnisse weitere hCG-Tests empfohlen.

- Zu Diagnosezwecken sollte der FastPack® IP und FastPack® hCG Immunoassay stets zusammen mit der Krankengeschichte, mit klinischen Untersuchungen des Patienten und sonstigen Erkenntnissen herangezogen werden
- Der hCG Assay wurde nicht für Point of Care evaluiert.
- Die Konzentration des humanen Chorion-Gonadotropin (hCG) einer gegebenen Probe kann von Test zu Test verschiedener Hersteller aufgrund unterschiedlicher Methodik und Spezifität, variieren. Die von einem Labor an einen Arzt befundeten Ergebnisse müssen die jeweilige Testmethodik des hCG Assay ausweisen. Werte die von verschiedenen Testmethoden ermittelt wurden dürfen nicht austauschbar verwendet werden.

## ERWARTETE WERTE / REFERENZINTERVALLE

Proben von 241 Personen, 115 Männer und 126 nicht schwangeren Frauen, von gesunden Blutspendern, ohne klinisch, abnormale Anzeichen. Die hCG Werte wurden mittels FastPack® IP und FastPack® hCG Immunoassay in Verbindung mit dem FastPack® IP System ermittelt um die hCG Konzentrationen der Referenzwertpopulation zu bestimmen. Das Referenzintervall (5. bis 95. Perzentil) für den FastPack® IP und FastPack® hCG Immunoassay ist für Männer <1.8 mIU/mL und <1.8 – 3.0 mIU/mL für nicht schwangere Frauen. Diese Referenzintervalle reflektieren die Spenderpopulation dieser Studiengruppe. Jedes Labor sollte ihre eigenen Referenzbereiche gemäß der eigenen Population bestimmen. Die Werteverteilung für nicht schwangere Frauen zeigt das folgende Histogramm.



## SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

### Präzision

Drei Kontrollserenpools wurden mit unterschiedlichen hCG Konzentrationen angereichert und mit 2 verschiedenen FastPack® IP und FastPack® hCG Reagenzchargen und 3 FastPack® IP Geräten getestet. Jede Kontrolle wurde in Doppelbestimmung pro Tag über 10 Tage getestet, dies ergibt insgesamt 20 wiederholte Bestimmungen pro Kontrolle. Die Daten wurden mittels der Varianzanalyse (ANOVA) analysiert und es wurden sowohl In-Assay als auch die gesamte Impräzision ermittelt. Mittelwerte, Standardabweichung (SD), und Variationskoeffizient (%CV) wurden für jede einzelne Kontrolllösung errechnet.

### In-Assay Ungenauigkeit

	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4
<b>Mittelwert mIU/mL hCG</b>	3.4	19.0	347.3	722.3
<b>SD</b>	0.37	1.8	21.5	73.7
<b>%CV</b>	10.8	9.4	6.2	10.2

### Gesamte Ungenauigkeit

	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4
<b>Mittelwert mIU/mL hCG</b>	3.4	19.0	347.3	722.3
<b>SD</b>	0.50	2.2	27.1	98.3
<b>%CV</b>	14.5	11.4	7.8	13.6

### Linearität

Für hCG das mit dem FastPack® IP und FastPack® hCG Assay bestimmt wurde, wurde gemäß CLSI EP-6A evaluiert. Diese Methode zeigt Linearität von 1,8 mIU/mL bis 940,6 mIU/mL, mit 5 mIU/mL zwischen 1.8 und 50 mIU/mL und 25 mIU/mL im Intervall zwischen 50 und 1000 mIU/mL hCG.

### Verdünnungslinearität

Zwei Serumpools mit hohen endogenen hCG Konzentrationen wurden im Verhältnis 1:2, 1:4, 1:8, und 1:16 mit proteinbasierten Tris Puffer verdünnt und in Dreifachbestimmung quantifiziert mit einer Charge FastPack® IP und FastPack® hCG und einem FastPack® IP Instrument. Die gemessenen Werte der Verdünnungen wurden mit den erwarteten Werten (mit demselben Assay bestimmt) verglichen, basierend auf den Werten der eigentlichen Probe und den entsprechenden Verdünnungsfaktoren (% Wiederfindung = [gemessener Wert / erwarteter Wert] X 100).

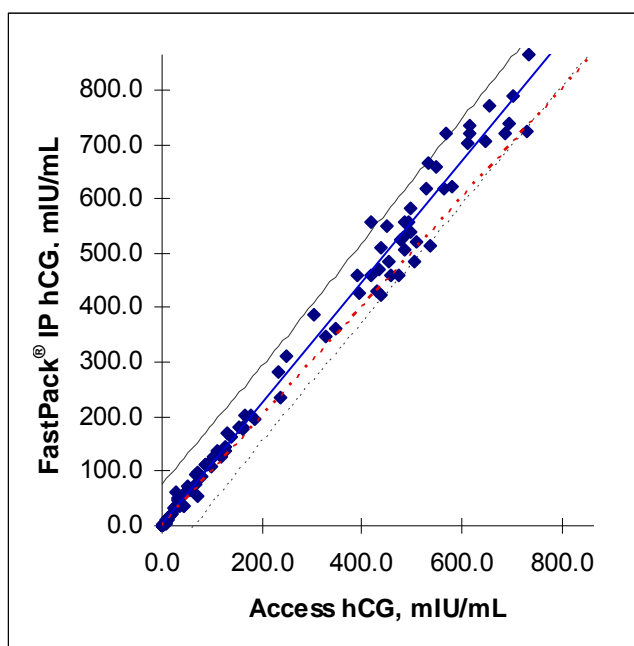
Serum Pool 1	Erwartet mIU/mL	Gemessen mIU/mL	% Wiederfindung
Neat	N/A	699.2	N/A
1:2	349.6	366.6	104.9
1:4	174.8	174.7	99.9
1:8	87.4	90.1	103.1
1:16	43.7	46.5	106.4

Serum Pool 2	Erwartet mIU/mL	Gemessen mIU/mL	% Wiederfindung
Neat	N/A	443.1	N/A
1:2	221.5	205.5	92.7
1:4	110.8	105.3	95.0
1:8	55.4	59.2	107.0
1:16	27.7	28.7	103.7

### Methodenvergleich

Klinische Serumproben (n=106) wurden verwendet um die Werte der FastPack® IP und FastPack® hCG Methode mit den Werten der Beckman-Coulter Access® hCG Methode zu vergleichen. Die Werte wurden mittels der Deming Regressionsanalyse mit den folgenden Korrelationskoeffizienten evaluiert.

n	Gemessener Bereich (mIU/mL)	Schnittpunkt (mIU/mL)	Steigung	R <sup>2</sup>
106	0.0 – 864.6	2.44	1.11	0.99



## STÖRENDE SUBSTANZEN

Die Effekte von ikterischen, lipämischen und hämolysierten Serumproben, sowie Serumproben mit hohen Proteinkonzentrationen, auf die hCG Werte wurden untersucht. Ein Serumpool mit endogener hCG Konzentration ~300 mIU/mL wurde mit bekannten Konzentrationen von Bilirubin, Triglyceriden, Hämoglobin und humanem Serumalbumin versetzt, ein anderer Serumpool mit endogenem hCG von ~3 mIU/mL mit denselben Konzentrationen der störenden Substanzen. Die gemessenen Werte der so präparierten Serumpools wurden mit den Werten ohne die störenden Substanzen verglichen und die Prozentabweichungen oder die absoluten Abweichungen in mIU/mL bestimmt. Diese Substanzen haben keine Interferenzen zu den unten angegebenen Werten ergeben.

	Störende Substanz			
	Bilirubin (30 mg/dL)	Triglyceride (1800 mg/dL)	Hämoglobin (500 mg/dL)	Humanes Albumin (3 g/dL)
Nicht versetzte Aliquote	303.4 mIU/mL	274.6 mIU/mL	260.6 mIU/mL	255.0 mIU/mL
Versetzte Aliquote	318.0 mIU/mL	288.9 mIU/mL	265.9 mIU/mL	260.6 mIU/mL
% Abweichung	+4.8%	+5.2%	+5.3%	+2.2%

	Störende Substanz			
	Bilirubin (30 mg/dL)	Triglyceride (1800 mg/dL)	Hämoglobin (500 mg/dL)	Humanes Albumin (3 g/dL)
Nicht versetzte Aliquote	3.8 mIU/mL	3.3 mIU/mL	2.3 mIU/mL	4.3 mIU/mL
Versetzte Aliquote	4.2 mIU/mL	3.7 mIU/mL	1.9 mIU/mL	4.4 mIU/mL
Absolute Abweichung	0.4	0.4	-0.4	0.1

## Kreuzreaktivität

Keine signifikanten Kreuzreaktivitäten (<0.5 mIU/mL) wurden gemessen. FastPack® hCG Probenverdünnungslösung wurde mit den folgenden kreuzreaktiven Substanzen versetzt: mit 1000 mIU/mL LH, mit 1000 mIU/mL FSH und mit 1000 µIU/mL TSH. Die molare Spezifität in Prozent ist ungefähr 110% wenn 25 mIU/mL der WHO 75/551 Freien βhCG Untergruppe zur FastPack® hCG Probenverdünnungslösung zugegeben wird.

## Nullgrenze (Limit of Blank (LOB)), Detektionsgrenze (Limit of Detection (LOD)), und Quantifizierungsgrenze (Limit of Quantitation (LOQ))

Die Nullgrenze (LOB, die höchste Messung die wahrscheinlich noch als Null-Probe erkannt wird), die Detektionsgrenze (LOD, die niedrigste Menge des Analytes in einer Probe die mit Typ I und Typ II gesetzten Fehlerraten von 5% nachgewiesen werden kann), und die Quantifizierungsgrenze (LOQ, die niedrigste Menge des Analytes in einer Probe, die zuverlässig nachgewiesen werden kann, und bei der der Gesamtfehler die vorbestimmte Bedingung für die Genauigkeit entspricht) wurden gemäß CLSI EP17-A für den FastPack® IP und FastPack® hCG Assay bestimmt. In dieser Studie wurde die Nullgrenze (LOB) durch 10 Wiederholungsbestimmungen der FastPack® hCG Probenverdünnungslösung und 3 verschiedenen FastPack® IP Analysegeräten und 2 verschiedenen Reagenzchargen ermittelt. Die roh gemessenen RLUs des Assay wurden mittels Kalibrationskurve jedes Assays in mIU/mL konvertiert. Der LOB war der höchste gemessene Wert. Dieser Wert war 0,8 mIU/mL hCG.

Der LOD wurde durch 80 Wiederholungen der Low-Kontrollprobe bestimmt. Gemäß der CLSI EP17-A Richtlinie, wurde der LOD durch die folgende Gleichung ermittelt:

$$\text{LOD} = \text{LOB} + (c_{\beta} * \text{SD}_S),$$

Wobei  $c_{\beta} = 1,645/(1-(1/(4 * f)))$ , und f der Freiheitsgrad ist.  $\text{SD}_S$  ist die Standardabweichung der Messungen. In dieser Studie war der LOD 1,8 mIU/mL hCG.

Für die LOQ Analyse, waren die vordefinierten Genauigkeitsziele 80-120% Wiederfindung bei <20% CV. In dieser Studie hat eine Kontrollprobe von 3.1 mIU/mL hCG die gestellten Kriterien für Wiederfindung und CV erfüllt (93,8% und 18,7%, daher war der festgestellte LOQ 3,1 mIU/mL hCG.

## REFERENZEN

- <sup>1</sup> Kardana A, et al. The heterogeneity of hCG. *Endocrinology* 1991; 129: 1541-1567.
- <sup>2</sup> Vaitukaitis JL. Recent progress in hormone research 1976; 32: 289.
- <sup>3</sup> Sokolove PJ, Faix JD. Agreement of intact and beta chain-specific HCG assays in abnormal pregnancy. *Journal of Clinical Immunoassay*, Fall, 1991; 14, No. 3: 196-199.
- <sup>4</sup> Vaitukaitis JL, Braunstein GD, Ross GT. A radioimmunoassay which specifically measures human chorionic gonadotropin in the presence of human luteinizing hormone. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1972; 113: 751-758.
- <sup>5</sup> Norman RJ, Buck RH, Joubert SM. Comparison of human chorionic gonadotrophin concentrations in the sera of patients with normal and abnormal pregnancy measured by radioimmunoassay and immunoradiometric assay. *South African Medical Journal* April, 1989; 75: 318-319.
- <sup>6</sup> Schroff, RJ, Foon, KA, *et.al.* Human anti-mouse immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Res*, 45:879 – 885, 1985
- <sup>7</sup> Approved Standard – procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. 5<sup>th</sup> Edition: H3-A5: 23(32), 2003, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
- <sup>8</sup> Approved guideline – procedures for the handling and processing of blood specimens, H18-A2; 19(21), 1999. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).



Qualigen, Inc.  
Carlsbad, CA 92011 USA  
Technische Unterstützung:  
+1 (760) 918-9165  
+1 (877) 709-2169



MDSS  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover  
Deutschland

