

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



FSH ELISA



REF DE1288

 96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS / CONTENIDO

1	INTRODUCTION	3
2	PRINCIPLE OF THE TEST	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	4
4	REAGENTS	5
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	6
6	ASSAY PROCEDURE	6
7	EXPECTED NORMAL VALUES	7
8	QUALITY CONTROL	7
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	8
10	LIMITATIONS OF USE	10
11	LEGAL ASPECTS	10
12	REFERENCES / LITERATURE	11
1	EINLEITUNG	12
2	TESTPRINZIP	12
3	VORSICHTSMAßNAHMEN	13
4	BESTANDTEILE DES KITS	13
5	PROBENVORBEREITUNG	14
6	TESTDURCHFÜHRUNG	15
7	ERWARTETE WERTE	16
8	QUALITÄTS-KONTROLLE	16
9	ASSAY CHARACTERISTIKA	17
10	GRENZEN DES TESTS	17
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	18
12	REFERENZEN / LITERATUR	18
1	INTRODUCCIÓN	19
2	FUNDAMENTO DEL ENSAYO	19
3	PRECAUCIONES	19
4	COMPONENTES DEL KIT	20
5	MUESTRAS	21
6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	21
7	VALORES ESPERADOS	22
8	CONTROL DE CALIDAD	22
9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	23
10	LIMITACIONES DE USO	23
11	ASPECTOS LEGALES	23
12	REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA	23
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	24

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DEMEDIATEC FSH ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of Follicle Stimulating Hormone (FSH) in serum.

1.2 Summary and Explanation

Follicle-Stimulating Hormone (FSH) and Luteinizing Hormone (LH) are intimately involved in the control of the growth and reproductive activities of the gonadal tissues, which synthesize and secrete male and female sex hormones through a negative feedback relationship (1,2). FSH is a glycoprotein secreted by the basophil cells of the anterior pituitary. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH), produced in the hypothalamus, controls the release of FSH from the anterior pituitary. Like other glycoproteins, such as LH, TSH, and HCG, FSH consists of subunits designated as alpha and beta. Hormones of this type have alpha subunits that are very similar structurally, therefore the biological and immunological properties of each are dependent on the unique beta subunit (3,4,5). In the female, FSH stimulates the growth and maturation of ovarian follicles by acting directly on the receptors located on the granulosa cells; follicular steroidogenesis is promoted and LH production is stimulated. The LH produced then binds to the theca cells and stimulates steroidogenesis. Increased intraovarian estradiol production occurs as follicular maturation advances, thereupon stimulating increased FSH receptor activity and FSH follicular binding. FSH, LH, and estradiol are therefore intimately related in supporting ovarian recruitment and maturation in women (6,7,9). FSH levels are elevated after menopause, castration, and in premature ovarian failure. The levels of FSH may be normalized through the administration of estrogens, which demonstrate a negative feedback mechanism. Abnormal relationships between FSH and LH, between FSH and estrogen have been linked to anorexia nervosa and polycystic ovarian disease. Although there are significant exceptions ovarian failure is indicated when random FSH concentrations exceed 40 mIU/mL (8). The growth of the seminiferous tubules and maintenance of spermatogenesis in men are regulated by FSH. However, androgens, unlike estrogens, do not lower FSH levels, therefore demonstrating a feedback relationship only with serum LH (10,11,12). For reasons not fully understood, azospermic and oligospermic males usually have elevated FSH levels. Tumors of the testes generally depress serum FSH concentrations, but levels of LH are elevated, as determined by radioimmunoassay. It has been postulated that the apparent LH increase may be caused by cross reactivity with hCG-like substances secreted by tumors of the testes (11,12). High levels of FSH in men may be found in primary testicular failure and Klinefelter syndrome. Elevated concentrations are also present in cases of starvation, renal failure, hyperthyroidism, and cirrhosis (1,3).

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DEMEDIATEC FSH ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the sandwich principle. The microtiter wells are coated with a monoclonal antibody directed towards a unique antigenic site on a FSH molecule. An aliquot of patient sample containing endogenous FSH is incubated in the coated well with enzyme conjugate, which is an anti-FSH monoclonal antibody conjugated with horseradish peroxidase. After incubation the unbound conjugate is washed off. The amount of bound peroxidase is proportional to the concentration of FSH in the sample. Having added the substrate solution, the intensity of colour developed is proportional to the concentration of FSH in the patient sample.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

- This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
- All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
- The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
- Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
- Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
- Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
- Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
- Allow the reagents to reach room temperature (21 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
- Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
- Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
- Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
- Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
- Some reagents contain Proclin, BND and MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
- TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
- Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
- For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DEMEDITEC.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **SORB MT Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells; Wells coated with anti-FSH monoclonal antibody
2. **CAL 0 – 5 LYO Standard (Standard 0-5)**, 6 vials (lyophilized), 1 mL; Concentration: 0; 5; 10; 20; 50; 100 mIU/mL. Conversion: 6 mIU/mL = 1 ng/mL; The standards are calibrated against 1. International Standard for Follicle Stimulation Hormone (FSH), human recombinant for immunoassay NIBSC code 92/510; see „Preparation of Reagents“; Contain non-mercury preservative.
3. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate**, 1 vial, 11 mL, ready to use; Anti-FSH antibody conjugated to horseradish peroxidase; Contain non-mercury preservative.
4. **SUB TMB Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use; Tetramethylbenzidine (TMB).
5. **STOP SOLN Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use; contains 0.5M H₂SO₄; Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.

Note: Additional *Standard 0* for sample dilution is available on request.

4.2 Material required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 ±10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Distilled or deionized water
- Timer
- Linear graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

When stored at 2 - 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2 - 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 - 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again. Opened kits retain activity for two months if stored as described above.

4.4 Reagents Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature prior to use.

Standards

Reconstitute the lyophilized contents of the standard vial with 1 mL deionized water.

Note: *The reconstituted standards are stable for 2 months at 2 °C - 8 °C.*

For longer storage freeze at -20 °C.

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheets (see chapter 13).

4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DEMEDITEC has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Only serum should be used in this assay. Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens. Please note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

5.1 Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 5 days at 2 °C - 8 °C prior to assaying. Specimens held for a longer time should be frozen only once at -20 °C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Standard 0* and reassayed as described in Assay Procedure. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

- a) dilution 1:10: 10 µL Serum + 90 µL Standard 0 (mix thoroughly)
b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL Standard 0 (mix thoroughly).

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
- Pipetting of all standards, samples, and controls should be completed within 6 minutes. (Note this especially for manual pipetting.)

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of Microtiterwells in the holder.
2. Dispense **25 µL** of each *Standard, controls* and samples with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **100 µL Enzyme Conjugate** into each well.
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
5. Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells **5 times** with aqua dest (400 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
Important note: The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
6. Add **100 µL** of *Substrate Solution* to each well.
7. Incubate for **10 minutes** at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **50 µL** of *Stop Solution* to each well.
9. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 ±10 nm** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4 Parameter curve fit. (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard 0 (0 mIU/mL)	0.07
Standard 1 (5 mIU/mL)	0.16
Standard 2 (10 mIU/mL)	0.26
Standard 3 (20 mIU/mL)	0.44
Standard 4 (50 mIU/mL)	0.92
Standard 5 (100 mIU/mL)	1.71

7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values. In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the DEMEDITEC FSH ELISA the following values are observed:

Population	5% - 95% Percentile [mIU/mL]
Males	0.89 - 11.72
Female	
Follicular Phase	2.0 - 10.0
Mid-cycle	7.0 - 20.0
Luteal Phase	2.0 - 10.0
Post-Menopausal	20.0 - 100.0

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels. The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results. It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results. Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods. After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DEMEDITEC directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.86 – 100 mIU/mL.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The following substances were tested for cross reactivity of the assay:

Hormone Tested	Concentration	Produced Color Intensity Equivalent to FSH in serum (mIU/mL)
hCG (WHO 1 st IRP75/537)	10.000 mIU/mL	0
	50.000 mIU/mL	0
	100.000 mIU/mL	0
TSH (WHO 2 nd IRP 80/558)	50 µIU/mL	0
	100 µIU/mL	0
LH (WHO 1 st IRP 68/40)	100 mIU/mL	0
	250 mIU/mL	0
	500 mIU/mL	0
Prolactin (WHO 1 st IRP 75/504)	100 ng/mL	0
	200 ng/mL	0
hGH (WHO 1 st IRP 66/217)	100 ng/mL	0
	200 ng/mL	0

9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity was calculated from the mean plus two standard deviations of twenty (20) replicate analyses of *Standard 0* and was found to be 0.856 mIU/mL.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra Assay

The within assay variability is shown below:

Sample	1	2	3
Mean (mIU/mL)	7.37	14.24	38.13
SD (mIU/mL)	0.58	0.64	1.60
CV (%)	7.91	4.50	4.18
n =	10	10	10

9.4.2 Inter Assay

The between assay variability is shown below:

Sample	1	2	3
Mean (mIU/mL)	7.33	13.85	37.42
SD (mIU/mL)	0.53	0.81	1.93
CV (%)	7.18	5.84	5.15
n =	11	11	11

9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding FSH solutions with known concentrations in a 1:1 ratio. The % Recovery has been calculated by multiplication of the ratio of the measurements and the expected values with 100.

Sample	Endogenous FSH (mIU/mL)	Added FSH (mIU/mL)	Measured Conc. FSH (mIU/mL)	Expected * FSH (mIU/mL)	Recovery (%)
1	54.64	0	54.6		
		50	74.8	77.3	96.8
		25	56.8	52.3	108.6
		10	40.8	37.3	109.4
		5	36.2	32.3	112.1
2	24.11	0	24.1		
		50	61.7	62.1	99.4
		25	38.2	37.1	103.1
		10	24.5	22.1	110.9
		5	18.8	17.1	110.4
3	7.01	0	7.0		
		50	52.9	53.5	98.9
		25	27.0	28.5	94.6
		10	11.9	13.5	88.5
		5	7.9	8.5	93.0

(* Endogenous FSH / 2 + added FSH because of a 1:1 dilution of serum with spike material.)

9.6 Linearity

Sample	Dilution	Measured Conc. (mIU/mL)	Expected Conc. (mIU/mL)	Recovery (%)
1	None	54.6	54.6	
	1:2	26.1	27.3	95.5
	1:4	12.6	13.7	92.0
	1:8	6.1	6.8	88.8
	1:16	3.3	3.4	95.6
2	None	24.1	24.1	
	1:2	13.4	12.1	111.0
	1:4	6.4	6.0	106.0
	1:8	3.2	3.0	107.6
	1:16	1.7	1.5	111.0
3	None	71.4	71.4	
	1:2	38.9	35.7	109.0
	1:4	19.4	17.8	108.5
	1:8	9.5	8.9	106.7
	1:16	4.7	4.5	106.1

10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1 Interfering Substances

Haemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and Triglyceride (up to 30 mg/mL) have no influence on the assay results.

10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of FSH in a sample.

10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test up to 1600 mIU/mL of FSH.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test. The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DEMEDITEC.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient. Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived. The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement. Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

12 REFERENCES / LITERATURE

1. Marshall, J. C.: *Clinic in Endocrinol. Metab.*, 4, 545 (1975).
2. Jeffcoate, S. L.: *Clinic. in Endocrinol. Metab.* 4, 521 (1975).
3. Cohen, K. L.: *Metabolism*, 26, 1165 (1977).
4. Shome, B. and Parlow, A. F.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 39, 199 (1974).
5. Lundy, L. E., Lee, S. G., Levy, W., et al.: *Obstet. Gynecol.*, 44, 14 (1974).
6. Ross, F. T., Vande Wiele, R. L. and Franty, A. G.: *Text of Endocrinol.*, Chapter 7, Ed.: R. H. Williams, W.B. Saunders, Philadelphia (1981).
7. Speroff, L.: *Clinic. Gynecol. Endocrinol. and Infert.*, Chapter 3, Ed: L. Speroff, R. H. Glass and M. G. Kase, Williams & Wilkins Baltimore (1978).
8. Rebar, R. W., Erickson, G. F. and Yen, S.S.C.: *Fertil. Steril.*, 37, 35 (1982).
9. Catt, K. J. and Pierce, J.G.: *Reprod. Endocrinol.*, Chapter 2, Ed: S.S.C. Yen and R. B. Jaffe, Philadelphia (1978).
10. Leonard, J. M., Leach, R. B., Couture, M. and Paulsen, C.A.: *J. Clinic. Endocrinol.*, 34, 209 (1972).
11. Reiter, E. O. and Lulin, H. E.: *J. Clinic. Endocrinol.*, 33, 957 (1971).
12. Abraham, G. E., Ed.: *Radioassay Systems in Clinic. Endocrinol.*, Marcel Dekker, Inc., New York (1981).
13. Engvall, E., *Methods in Enzymology*, Volume 70, VanVunakis, H. and Langone, J.J., (eds.), Academic Press, New York, 419 (1980).
14. Uotila, M., Ruoslahti, E. and Engvall, E., *J. Immunol. Methods*, 42, 11 (1981).

1 EINLEITUNG

Der **DEMEDITEC FSH ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von FSH in Serum eingesetzt.
Nur für In-vitro Diagnostik.

KLINISCHE BEDEUTUNG

Follikelstimulierendes Hormon (FSH) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 30.000 Dalton. Es besteht aus zwei Untereinheiten:

1. Die Alpha-Untereinheit ist fast identisch mit der Alpha-Untereinheit der anderen Hypophysenhormone.
2. Die Beta-Untereinheit bestimmt die immunologische Spezifität und die biologische Aktivität des Hormons.

FSH (Gonadotropin I) wird in den Betazellen des Hypophysenvorderlappens gebildet und unter Einwirkung des Gonadotropin-Releasing-Faktors ins Blut abgegeben. Bei der Frau ist FSH verantwortlich für die Follikelreifung, die Entwicklung des Graafschen Follikels und das Heranreifen des Eis im Verlauf des Menstruationszyklus. Die Menge an zirkulierendem FSH wird mittels des negativen Feedbackmechanismus durch die Hormone Östradiol und Progesteron kontrolliert. Die Bestimmung von FSH (zusammen mit LH) dient der Diagnose von primärer und sekundärer Amenorrhöe und/oder anovulatorischen Menstruationszyklen. Erhöhte FSH- und LH-Werte und niedrige Östrogen-Konzentrationen zeigen eine primäre Ovarialinsuffizienz an, im Allgemeinen verbunden mit primärer Amenorrhöe. Niedrige FSH-, LH- und Östrogen-Werte zeigen eine Funktionsstörung der Hypophyse bzw. des Hypothalamus an, die sich in sekundärer Amenorrhöe äußert. Beim Mann stimuliert FSH die Spermatogenese sowie (zusammen mit LH) die Testosteron-Produktion durch die Leydigischen Zellen der Testes. Die Menge an zirkulierendem FSH wird durch die Hormone Östradiol und Testosteron kontrolliert. Die Bestimmung von FSH und LH dient beim Mann dem Nachweis von primärer Hodenfunktionsstörung und selektiver Funktionsstörung der Sertoli-Zellen. Primäre Hodenfunktionsstörungen führen zu einem Testosteron-Defizit und somit zu erhöhten FSH- und LH-Werten. Beim Sertoli-Zellen-Syndrom sind die Testosteron- und LH-Werte normal, aber die Spermatogenese ist gestört und die FSH-Werte sind erhöht. Sekundäre Hodenfunktionsstörungen sind durch eine ungenügende Funktion der Hypophyse oder des Hypothalamus bedingt, die mit erniedrigten zirkulierenden FSH-Werten einhergeht.

2 TESTPRINZIP

Der DEMEDITEC FSH ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der Sandwichtechnik basiert. Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine definierte Antikörper-Bindungsstelle des FSH-Moleküls gerichtet ist. Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und mit einem Enzym-Konjugat inkubiert. Das Konjugat enthält einen anti-FSH-Antikörper, der mit Meerrettichperoxidase konjugiert ist. Es wird ein Sandwichkomplex gebildet. Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist proportional der FSH-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der Stop Solution sollte vermieden werden, da sie 0.5 M H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **SORB MT Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar),
Mit monoklonalem anti-FSH-Antikörper beschichtet.
2. **CAL 0 – 5 LYO Standard (Standard 0-5)**, 6 Fläschchen (lyoph.), je 1 mL
Konzentrationen: 0, 5; 10; 20; 50; 100 mIU/mL. Umrechnungsfaktor: 6 mIU/mL = 1 ng/mL
Die Standards sind kalibriert gegen den 1. International Standard for Follicle Stimulation Hormone (FSH), human recombinant for immunoassay NIBSC code 92/510
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 11 mL, gebrauchsfertig
Anti-FSH-Antikörper mit Meerrettichperoxidase konjugiert. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **SUB TMB Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig
Substratlösung TMB
5. **STOP SOLN Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; enthält 0,5M H₂SO₄. Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.

Anmerkung: Zusätzlicher *Standard 0* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

4.2 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 ±10 nm Filter)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser.

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C - 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C - 8 °C gelagert werden. Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C - 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits zwei Monate ihre Reaktivität.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

Standards

Rekonstituieren Sie den lyophilisierten Inhalt der Standardfläschchen mit 1,0 mL destilliertem Wasser.

Achtung: Bei 2 °C - 8 °C sind die rekonstituierten Standards 2 Monate haltbar.

Bei einer längeren Aufbewahrung bei -20°C einfrieren.

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt, Kapitel 13.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DEMEDITEC in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENVORBEREITUNG

Nur Serum sollte in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden. Lipämische, ikterische und/oder stark hämolysierte Proben sollten nicht verwendet werden. Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

5.1 Probenentnahme

Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 5 Tage bei 2 °C - 8 °C gelagert werden. Für eine längere Aufbewahrung sollten die Proben eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Standard 0* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel:

a) Verdünnung 1:10: 10 µL Serum + 90 µL Standard 0 gründlich mischen)

b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL Standard 0 (gründlich mischen).

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchgemischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
- Das Pipettieren aller Standards, Kontrollen und Proben sollte innerhalb von 6 Minuten durchgeführt werden. (Beachten Sie dies besonders bei einem manuellen Testansatz.)

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 25 µL Standards**, Kontrollen und Proben mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells geben.
3. **100 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben. Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
4. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren. Platte nicht abdecken.
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 5-mal mit destilliertem Wasser waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen. **Achtung:** Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrittes!
6. **100 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
7. **10 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
9. Die Optische Dichte bei **450 ±10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der **Stop Solution** bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4-Parameter Gleichung bestimmt. (4 Parameter Rodbard oder 4 Parameter Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DEMEDITEC ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard 0 (0 mIU/mL)	0,07
Standard 1 (5 mIU/mL)	0,16
Standard 2 (10 mIU/mL)	0,26
Standard 3 (20 mIU/mL)	0,44
Standard 4 (50 mIU/mL)	0,92
Standard 5 (100 mIU/mL)	1,71

7 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt. In einer Studie wurden die Proben von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem DEMEDITEC FSH ELISA folgende Werte:

Population	5% - 95% Percentile mIU/mL
Männer	0,89 - 11,72
Frauen	
Follikuläre Phase	2,0 - 10,0
Zyklusmitte	7,0 - 20,0
Luteal-Phase	2,0 - 10,0
Post-Menopausal	20,0 - 100,0

8 QUALITÄTS-KONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden. Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden. Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern. Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden. In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

9 ASSAY CHARACTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,86 – 100 mIU/mL.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

9.3 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert plus der zweifachen Standardabweichung des Standards 0 (n = 20), beträgt 0,856 mIU/mL.

Die Daten zu:

9.4 Präzision

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

10 GRENZEN DES TESTS

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Interferenzen

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0.5 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 30 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des FSH-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook Effekt tritt bei Proben mit bis zu 1600 mIU/mL FSH nicht auf.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen. Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1. genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2. erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

12 REFERENZEN / LITERATUR

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

1 INTRODUCCIÓN

El **Kit de inmunoensayo enzimático DEMEDITEC FSH** proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del Hormona estimulante folicular (FSH) en suero. **Este ensayo está diseñado solo para diagnóstico *in vitro*.**

2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit DEMEDITEC FSH ELISA es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el principio del sándwich. Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo monoclonal dirigido contra un único foci antigénico en una molécula de FSH. Se incuba una alícuota de una muestra perteneciente a un paciente que contiene FSH endógena en los pocillos recubiertos con el enzima conjugado, que es un anticuerpo anti- FSH conjugado con la peroxidasa endógena. Después de la incubación se lava el conjugado que no se ha unido. La cantidad de peroxidasa unida es proporcional a la concentración de FSH en la muestra. Cuando se añade la solución del sustrato de la peroxidasa, la intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de FSH en la muestra del paciente.

3 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*.
- Por favor, se usa solo la versión válida de la metodología técnica incluido aquí en el kit.
- Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
- Evitar contacto con *Stop Solution* que contiene H₂SO₄ 0,5 M. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
- No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
- Usar guantes de látex cuando se utilicen las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede dar resultados erróneos.
- El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
- Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar diferentes.
- Los compuestos químicos y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- Las hojas de los datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a Demeditec Diagnostics GmbH.

4 COMPONENTES DEL KIT

4.1 Componentes del Kit

1. **SORB MT Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12 x 8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti- FSH (monoclonal).
2. **CAL 0 – 5 LYO Standard (Standard 0-5)**, (Estándar), 6 viales (liofilizados), 1 mL; Concentraciones: 0, 5; 10; 20; 50; 100 mIU/mL. Conversión: 6 mIU/mL = 1 ng/mL; Los estándares están calibrados según WHO 1st International Standard para FSH NIBSC código (92/510). (1. Intern. Standard for Follicle Stimulation Hormone (FSH), human recombinant for immunoassay)
3. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático), 1 vial, 11 mL, listo para usar, Anticuerpo anti- FSH conjugado con la Peroxidasa de rábano;
4. **SUB TMB Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 14 mL, listo para usar, Tetrametilbencidina (TMB).
5. **STOP SOLN Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar, contiene 0.5M H₂SO₄. Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en la piel.

Nota: Se puede solicitar el *Standard 0* para la dilución de la muestra.

4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450 ±10 nm)
- Micropipetas de precisión variable calibradas.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2 - 8 °C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha. Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 - 8 °C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2 - 8 °C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo. Los kits abiertos conservan su actividad durante dos meses si se almacenan como se ha descrito arriba.

4.4 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente antes de usarse.

Standards

Reconstituir los contenidos liofilizados de los viales de los estándares con 1 mL de agua destilada.

Nota: Los estándares reconstituidos son estables durante 2 meses a 2 - 8 °C.

Para períodos más largos congelar a -20 °C.

4.5 Eliminación del Kit

La eliminación del kit debe realizarse de acuerdo con las leyes nacionales. En las hojas de datos de seguridad se proporciona información especial de este producto (ver capítulo 13).

4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a DEMEDITEC, no más tarde de una semana después de recibir el kit. No deben utilizarse componentes dañados para llevar a cabo un ensayo. Han de almacenarse hasta que se encuentre una solución. Después de esto, deben ser eliminados de acuerdo con las leyes oficiales.

5 MUESTRAS

Sólo debe utilizarse suero en este ensayo. No usar muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas. Tener en cuenta: No deben usarse muestras que contengan acida sódica.

5.1 Toma de muestras

Suero:

Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette para el suero), permitir oagulación, y separar el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugar antes de la coagulación completa. Las muestras de pacientes que reciben terapia anticoagulante requieren más tiempo para coagular.

5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 5 días a 2 °C - 8 °C antes del ensayo. Las muestras almacenadas por un período de tiempo mas largo han de congelarse sólo una vez a -20 °C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

5.3 Dilución de las muestras

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el estándar mas concentrado, ha de diluirse con *Standard 0* y volver a ensayarse como se describe en el rocedimiento de Ensayo. Para el cálculo de las concentraciones habrá que tener en cuenta el factor de dilución.

Ejemplo:

- a) dilución 1:10: 10 µL Suero + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente)
- b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente).

6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada estándar, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La absorbancia es función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.
- El pipeteo de todos los estándares, muestras y controles debe estar completado en 6 minutos. (Tenerlo en cuenta especialmente para el pipeteo manual).

6.2 Procedimiento de ensayo

Cada uno debe incluir una curva de estándares.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **25 µL** de cada *Standard*, *Control* y muestras con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Dispensar **100 µL** de *Enzyme Conjugate* a cada pocillo. Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
4. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente.
5. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos. Lavar los pocillos **5 veces** con agua destilada (400 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales. **Nota importante**: La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!
6. Adicionar **100 µL** de *Substrate Solution* a cada pocillo.
7. Incubar durante **10 minutos** a temperatura ambiente.
8. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **50 µL** de *Stop Solution* a cada pocillo.
9. Leer la OD a **450 ±10 nm** con un lector de microplacas **dentro de los 10 minutos** después de la adición de la *Stop Solution*.

6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de absorbancia media para cada conjunto de estándares, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar mediante la representación de la absorbancia media obtenida para cada estándar frente a su concentración con el valor de absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de absorbancia media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en las instrucciones de uso se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 Parámetros. (4 Parámetros Rodbard o 4 Parámetros Marquardt son los métodos preferidos.) Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de la muestra puede leerse directamente de la curva de estándares. Las muestras con concentraciones superiores al mayor estándar han de diluirse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.

6.3.1 Ejemplo de una Curva Estándar Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y no pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

Estándar	Unidades Ópticas (450 nm)
Standard 0 (0 mIU/mL)	0.07
Standard 1 (5 mIU/mL)	0.16
Standard 2 (10 mIU/mL)	0.26
Standard 3 (20 mIU/mL)	0.44
Standard 4 (50 mIU/mL)	0.92
Standard 5 (100 mIU/mL)	1.71

7 VALORES ESPERADOS

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus valores normales e inusuales. En un estudio con adultos aparentemente sanos utilizando el DEMEDITEC FSH ELISA se observaron los siguientes valores:

Población	Percentil 5% - 95% [mIU/mL]
Hombres	0,89 - 11,72
Mujeres	
Fase Folicular	2.0 - 10.0
Ciclo menstrual	7.0 - 20.0
Fase Luteal	2.0 - 10.0
Posmenopausia	20.0 –100.0

8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control se recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico. Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados. Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados. Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos. En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado. Después de comprobar los asuntos mencionados arriba sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DEMEDITEC directamente.

9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 0,86 – 100 mIU/mL.

9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.3 Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica se calculó a partir de la media mas dos desviaciones estándar de veinte (20) réplicas del *Estándar 0* y resultó ser 0.856 mIU/mL.

9.4 Precisión

9.5 Recuperación

9.6 Linealidad

Consultar el manual de usuario en inglés.

10 LIMITACIONES DE USO

Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificaciones del ensayo pueden influenciar los resultados.

10.1 Sustancias que pueden interferir

Hemoglobina (hasta 4 mg/mL), Bilirrubina (hasta 0.5 mg/mL) y Triglicéridos (hasta 30 mg/mL) no influyen los resultados del ensayo.

10.2 Interferencias con drogas

Hasta ahora no se han encontrado sustancias (drogas) conocidas por nosotros, que tengan influencia en la medida de FSH en una muestra.

10.3 Efecto Gancho-Dosis-Elevada

No se ha observado efecto gancho en este ensayo hasta 1600 mIU/mL de FSH.

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo. Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DEMEDITEC.

11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente. Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas. Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo












11.3 Responsabilidad

Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición. Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

12 REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA

Consultar el manual de usuario en inglés.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta