



DCM010-13
Ed. 01/2015

FSH ELISA

per analisi di routine

Test per la determinazione immunoenzimatica diretta dell'Ormone Follicolo-Stimolante (FSH) nel siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO010

DESTINAZIONE D'USO

Il kit Diametra FSH ELISA è un metodo immunoenzimatico diretto in fase solida per la determinazione quantitativa dell'Ormone Follicolo-Stimolante (FSH) nel siero o plasma umano.

Il kit FSH ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. INTRODUZIONE E SPIEGAZIONE DEL TEST

L'ormone follicolo-stimolante (FSH) è una glicoproteina costituita da 2 subunità aventi una massa molecolare di circa 35,500 daltons. La subunità α è simile a quella degli altri ormoni pituitari [ormone luteinizzante (LH), ormone stimolante la tiroide (TSH) e gonadotropina corionica (hGC)] mentre la subunità β è unica. La subunità β conferisce l'attività biologica alla molecola. La stimolazione dell'ormone rilasciante la gonadotropina (GnRH) provoca il rilascio dell'FSH e dell'LH dalla ghiandola pituitaria, e questi vengono trasportati dal sangue fino ai siti in cui agiscono, cioè i testicoli e le ovaie.

Negli uomini, l'FSH agisce sulle cellule del Sertoli dei testicoli, stimolando la sintesi dell'inibina, che pare inibire specificatamente una ulteriore secrezione di FSH, e della proteina legante androgena. Quindi, esso favorisce indirettamente la spermatogenesi.

Nelle donne, l'FSH agisce sulle cellule granulose delle ovaie, stimolando la steroidogenesi. Tutti i cicli mestruali con ovulazione possiedono una sequenza caratteristica di secrezione di FSH e di LH. Il ciclo mestruale è suddiviso in fase follicolare e fase luteinica dall'impulso che avviene a metà ciclo delle gonadotropine (LH and FSH). Con l'avanzare della fase follicolare, la concentrazione di FSH diminuisce. Con l'avvicinarsi del momento dell'ovulazione, circa a metà ciclo, l'FSH raggiunge il massimo livello (con una entità minore tuttavia, dell'LH).

L'utilità clinica della determinazione dell'ormone follicolo-stimolante (FSH) nell'accertamento dell'omeostasi della regolazione di fertilità via asse ipotalamico - pituitario - gonadico è stata largamente dimostrata (1,2).

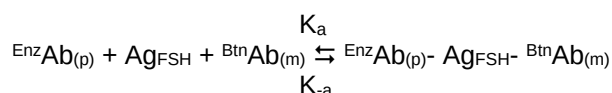
2. PRINCIPIO DEL TEST

I reagenti essenziali richiesti per il test immunoenzimatico includono anticorpi ad alta affinità e specificità (coniugati con enzima e immobilizzati) con riconoscimento di epitopi diversi e distinti, in eccesso, e antigene nativo.

In questo procedimento l'immobilizzazione si verifica durante il test sulla superficie dei pozzetti della micropiastra attraverso l'interazione della streptavidina fissata sui pozzetti e dell'anticorpo anti FSH biotinilato aggiunto.

Mescolando l'anticorpo biotinilato, l'anticorpo coniugato con enzima e un siero contenente l'antigene nativo, si verifica la reazione tra l'antigene nativo e gli anticorpi, senza competizione e ingombro sterico, per formare un complesso sandwich solubile.

L'interazione è illustrata dall'equazione seguente:



$\text{BtnAb}_{(m)}$ = anticorpo monoclonale biotinilato (quantità in eccesso)

Ag_{FSH} = antigene FSH nativo (quantità variabile)

$\text{EnzAb}_{(p)}$ = anticorpo policlonale marcato con enzima (quantità in eccesso)

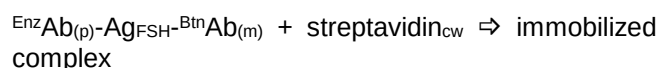
$\text{EnzAb}_{(p)} - \text{Ag}_{\text{FSH}} - \text{BtnAb}_{(m)}$ = complesso sandwich antigene-anticorpi

K_a = costante di associazione

K_a = costante di dissociazione

Contemporaneamente il complesso si fissa sul pozzetto tramite la reazione ad alta affinità tra la streptavidina e l'anticorpo biotinilato.

Questa interazione è descritta di seguito:



$\text{Streptavidin}_{\text{cw}}$ = streptavidina immobilizzata sul pozzetto

Immobilized complex = complesso sandwich antigene-anticorpi

Una volta raggiunto l'equilibrio, la frazione di antigene legata all'anticorpo viene separata dall'antigene libero con un lavaggio. L'attività enzimatica della frazione legata è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nativo.

Utilizzando diversi sieri di riferimento con valori noti di antigene è possibile costruire una curva dose-risposta sulla quale determinare la concentrazione dell'antigene di campioni ignoti.

3. REAGENTI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1 Reagenti e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0	REF	DCE002/1006-0
CAL1	REF	DCE002/1007-0
CAL2	REF	DCE002/1008-0
CAL3	REF	DCE002/1009-0
CAL4	REF	DCE002/1010-0
CAL5	REF	DCE002/1011-0

2. Control (1 flacone, 1 mL)

La concentrazione del Controllo è indicata sul Certificato di Analisi

REF DCE045/1003-0

3. Conjugate (1 flacone, 12 mL)

Anticorpo anti FSH coniugato a Perossidasi di rafano (HRP)

Anticorpo anti FSH coniugato a Biotina

REF DCE002/1002-0

4. Coated Microplate (1 microplate breakable)

Streptavidina adsorbita nella micropiastra

REF DCE002/1003-0

5. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H₂O₂-TMB 0,26 g/L (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE005-0

7. 10X Conc. Wash Solution (1 flacone, 50 mL)

Tampone fosfato 0,2M pH 7.4

REF DCE054-0

3.2 Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3 Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

Note

Conservare i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.

- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di FSH da 5 mIU/mL a 100 mIU/mL.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₅)

I Calibratori sono pronti all'uso, sono calibrati contro lo Standard Internazionale WHO 2nd IRP 78/549 ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
mIU/mL	0	5	10	25	50	100

Per campioni con concentrazione superiore a 100 mIU/mL diluire 1:2 il campione con il Calibratore 0. Dopo l'apertura, i Calibratori sono stabili 6 mesi a 2÷8°C.

6.2. Preparazione della soluzione di lavaggio

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "10X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2÷8°C per almeno 30 giorni.

Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli, in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli; per una maggiore precisione diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione.

6.3. Preparazione del Campione

Utilizzare campioni di siero o plasma.

Nota: si sconsiglia l'utilizzo di EDTA-plasma, in quanto potrebbe interferire con il dosaggio del campione.

Osservare le consuete precauzioni nella raccolta di campioni provenienti da prelievo per via venosa.

Per un confronto approfondito che permetta di stabilire valori nella norma, raccogliere i campioni di siero al mattino e a digiuno.

Per ottenere il siero, il sangue deve essere raccolto in un tubo da prelievo per via venosa, senza additivi o anticoagulanti; lasciare coagulare il sangue; centrifugare il campione per separare il siero dalle cellule.

I campioni possono esser refrigerati a 2÷8°C per un periodo massimo di 5 giorni. Qualora non fosse possibile testare i campioni entro tale periodo, essi possono essere conservati a temperature di -20°C fino a 30 giorni. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti.

Se testati in duplicato, sono necessarie quantità di 0,100 mL dei campioni.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.

- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagenti	Calibratori	Campioni /Controllo	Bianco
Campioni /Controllo		50 µL	
Calibratori C ₀ -C ₅	50 µL		
Coniugato	100 µL	100 µL	
Incubare 1 h a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione. Lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di soluzione di lavaggio diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrato	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22÷28°C), al riparo dalla luce.			
Stop solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO DI QUALITÀ

Ogni laboratorio dovrebbe testare i controlli interni con livelli compresi nel range di basso, normale ed alto per monitorare le prestazioni del saggio. Questi controlli dovrebbero essere trattati come campioni incogniti e i valori determinati in ogni seduta. Conservare le carte di controllo qualità, per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Dovrebbero inoltre essere utilizzati pertinenti metodi statistici per verificare l'andamento. Deviazioni significative rispetto alle prestazioni stabilite possono indicare un inosservato cambio di condizioni sperimentali o una degradazione dei reagenti kit. Devono essere usati reagenti freschi per determinare la ragione delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (E_m) di ciascun punto della curva di calibrazione (C₀-C₅) e di ogni campione.

8.2. Curva di calibrazione

Tracciare su un grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (E_m) di ciascun calibratore (C₀-C₅) in funzione delle concentrazioni.

Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calcolo dei risultati

Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in mIU/mL.

9. VALORI ATTESI

Gli intervalli di riferimento sono riportati nella tabella seguente:

	FSH (mIU/mL)
MASCHI	1 – 14
FEMMINE:	
Fase follicolare	3 – 12
Fase ovulatoria	8 – 22
Fase luteinica	2 – 12
Menopausa	35 – 151

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione “normale” è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un’indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. LIMITI DELLA PROCEDURA

- **Per uso diagnostico considerare i valori di FSH in aggiunta ad altri dati disponibili al medico.** Seguire le note procedurali ed eseguire attentamente il test al fine di ottenere risultati validi. Qualsiasi modifica della procedura potrebbe alterare i risultati. FSH dipende da svariati fattori diversi dall'omeostasi della pituitaria. La sola determinazione di FSH non può quindi fornire un completo quadro clinico sullo stato del paziente.
- FSH è soppresso dagli estrogeni ma nelle donne che fanno uso di contraccettivi orali i livelli possono essere bassi o normali. Diete drastiche e perdita di peso comportano una riduzione della concentrazione di gonadotropina
- Per campioni di pazienti con alti livelli di FSH possono si può verificare l'effetto gancio, per cui essi possono presentare paradossalmente bassi valori di assorbanza. Si consiglia di diluire 1:100 con il calibratore 0 quindi dosarli nuovamente (moltiplicare il risultato per 100). Tuttavia, è stato riscontrato che valori fino a 2000 mIU/mL hanno avuto una assorbanza maggiore di quella del calibratore più alto.
- Pazienti che ricevono preparazioni di anticorpi monoclonali murini per la diagnosi della terapia possono presentare anticorpi umani anti-topo (HAMA) e quindi dare risultati falsi positivi o falsi negativi.

11. CARATTERISTICHE DEL SAGGIO

11.1. Precisione

11.1.1. Intra-assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (20x) la misura di tre differenti sieri di controllo in un'unica seduta analitica. La variabilità intra-assay è $\leq 9,7\%$.

11.1.2. Inter-assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è $\leq 8,0$.

11.2. Correlazione

Il kit Diametra FSH (Y) è stato comparato con un kit disponibile in commercio (X). Sono stati testati 35 sieri. La curva di regressione lineare è:

$$Y = 0,91 \cdot X + 3,41$$

$$r^2 = 0,969$$

Il nuovo kit Diametra FSH (Y) è stato comparato con il precedente kit Diametra FSH (X). Sono stati testati 60 sieri. La curva di regressione lineare è:

$$Y = 1,01 \cdot X - 0,44$$

$$r^2 = 0,953$$

11.3. Sensibilità

La concentrazione minima di FSH misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,17 mIU/mL.

11.4. Specificità

La cross-reattività del kit FSH Diametra verso le sostanze potenzialmente interferenti è stata stimata aggiungendo le sostanze a varie concentrazioni ad una matrice di siero. La cross-reattività è stata calcolata valutando il rapporto tra la concentrazione della sostanza interferente e la concentrazione di FSH necessario per produrre la stessa OD.

Sostanza testata	Concentrazione	Cross Reattività
FSH	---	100,0%
HCG	5000 mIU/mL	N.D.
LH	400 mIU/mL	N.D.
Prolactin	2000 ng/mL	N.D.
TSH	1000 mIU/L	N.D.

11.5. Accuratezza

Tre differenti campioni sono stati arricchiti con 3, 6, 12 e 24 mIU/mL di FSH; la prova di recupero ha dato un valore medio ($\pm$ SD) di $97,83\% \pm 8,52\%$.

Tre differenti campioni sono stati diluiti 2, 4 e 8 volte con il Calibratore 0; la prova di diluizione ha dato un valore medio ($\pm$ SD) di $105,54\% \pm 5,36\%$.

12. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

- Odell, W.D., Parlow, A.F., et al, *J Clin Invest*, 47, 2551 (1981).
- Saxema, B.B., Demura, H.M., et al, *J Clin Endocrinol Metab.*, 28, 59 (1968).
- Wennink JM, Delemarre-van de Waal HA, Schoemaker R, Schoemaker H, Schoemaker J. 1990 Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone secretion patterns in girls throughout puberty measured using highly sensitive immunoradiometric assays. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 33:333–344.
- Winter JS, Faiman C. 1973 The development of cyclic pituitarygonadal function in adolescent females. *J Clin Endocrinol Metab*. 37:714–718.
- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E 1997 The follicle stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 18:739–773.
- Vitt UA, Kloosterboer HJ, Rose UM, Mulders JW, Kiesel PS, Bete S, Nayudu PL 1998 Isoforms of human recombinant folliclestimulating hormone: comparison of effects on murine follicle development *in vitro*. *Biol Reprod* 59:854–861.
- Layman LC, Lee EJ, Peak DB, Namnoum AB, Vu KV, van Lingen BL, Gray MR, McDonough PG, Reindollar RH, Jameson JL 1997 Delayed puberty and hypogonadism caused by mutations in the folliclestimulating hormone β subunit gene. *N Engl J Med* 337:607–611.
- Robertson DR 1991 Circulating half-lives of follicle stimulating hormones and luteinizing hormone in pituitary extracts and isoform fractions of ovariectomized and intact ewes. *Endocrinology* 129:1805– 1813.
- Wide L 1981 Electrophoretic and gel chromatographic analyses of follicle stimulating hormone in human serum. *Ups J Med Sci* 86:249–258.
- Berger P, Bidart JM, Delves PS, Dirnhofer S, Hoermann R, Isaacs N, Jackson A, Klonisch T, Lapthorn A, Lund T, Mann K, Roitt I, SchwarzS, Wick G 1996 Immunochemical mapping of gonadotropins. *Mol Cell Endocrinol* 125:33–43.

Ed. 01/2015

DCM010-13

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15

20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,

06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM010-13
Ed. 01/2015

FSH ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of the Follicle-Stimulating Hormone (FSH) in human serum or plasma.

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO010

INTENDED USE

Diametra FSH ELISA kit is a direct solid phase immunoassay for the quantitative determination of Follicle-Stimulating Hormone (FSH) in human serum or plasma.

FSH ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Follicle Stimulating hormone (FSH) is a glycoprotein consisting of two subunits with an approximate molecular mass of 35,500 daltons. The α- subunit is similar to other pituitary hormones [luteinizing stimulating hormone (LH), thyroid stimulating hormone (TSH) and chorionic gonadotropin (hCG)] while the β- subunit is unique. The β- subunit confers the biological activity to the molecule. Stimulation by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) causes release of FSH, as well as LH, from the pituitary and is transported by the blood to their sites of action, the testes or ovary.

In men, FSH acts on the Sertoli cells of the testis, stimulating the synthesis of inhibin, which appears to specifically inhibit further FSH secretion, and androgen-binding protein. Thus, it indirectly supports spermatogenesis.

In women, FSH acts on the granulosa cells of the ovary, stimulating steroidogenesis. All ovulatory menstrual cycles have a characteristic pattern of FSH, as well as LH, secretion. The menstrual cycle is divided into a follicular phase and a luteal phase by the midcycle surge of the gonadotropins (LH and FSH). As the follicular phase progresses, FSH concentration decreases. Near the time ovulation occur, about midcycle, FSH peaks (lesser in magnitude than LH) to its highest level.

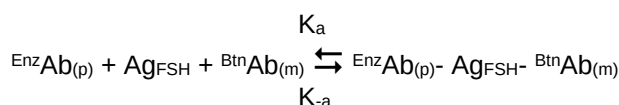
The clinical usefulness of the measurement of Follicle Stimulating hormone (FSH) in ascertaining the homeostasis of fertility regulation via the hypothalamic - pituitary - gonadal axis has been well established (1,2).

2. PRINCIPLE OF THE TEST

The essential reagents required for an immunoassay include high affinity and specificity antibodies (enzyme-linked and immobilised) with different and distinct epitope recognition, in excess, and native antigen.

In this procedure the immobilization takes place during the assay at the surface of a microplate well through the interaction of streptavidin coated on the well and exogenously added biotinylated monoclonal anti FSH antibody.

Upon mixing monoclonal biotinylated antibody, the enzyme labeled antibody and a serum containing the native antigen, reaction results between the native antigen and the antibodies without competition or steric hindrance to form a soluble sandwich complex. The interaction is illustrated by the following equation:



BtAb_(m) = biotinylated monoclonal antibody (Excess quantity)

Ag_{FSH} = native FSH antigen (variable quantity)

EnzAb_(p) = enzyme labeled polyclonal antibody (Excess quantity)

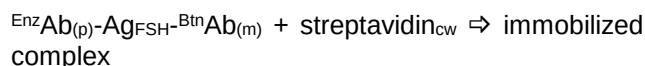
EnzAb_(p) - Ag_{FSH} - BtAb_(m) = antigen-antibodies sandwich complex

K_a = rate constant of association

K_{-a} = rate constant of disassociation

Simultaneously the complex is deposited to the well through the high affinity reaction of streptavidin and biotinylated antibody.

This interaction is illustrated below:



Streptavidin_{cw} = streptavidin immobilized on well

Immobilized complex = antibodies-antigen sandwich bound.

After equilibrium is attained, the antibody-bound fraction is separated from unbound antigen by a washing step.

The enzyme activity in the antibody-bound fraction is directly proportional to the native antigen concentration.

By using several different serum references of known antigen values, a dose response curve can be

generated from which the antigen concentration of an unknown can be ascertained.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1 Reagents and Materials Supplied in the Kit

1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

CAL0	REF DCE002/1006-0
CAL1	REF DCE002/1007-0
CAL2	REF DCE002/1008-0
CAL3	REF DCE002/1009-0
CAL4	REF DCE002/1010-0
CAL5	REF DCE002/1011-0

2. Control (1 vial, 1 mL)

Control concentration is indicated on the Certificate of Analysis

REF DCE045/1003-0

3. Conjugate (1 vial, 12 mL)

Antibody anti FSH conjugated with Horseradish peroxidase (HRP)

Antibody anti FSH conjugated with Biotine

REF DCE002/1002-0

4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Streptavidin adsorbed on microplate

REF DCE002/1003-0

5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H₂O₂-TMB 0.26 g /L (avoid any skin contact)

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)

REF DCE005-0

7. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)

Phosphate buffer 0.2M pH 7.4

REF DCE054-0

3.2 Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3 Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

Store all reagents at 2-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable up to expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.

- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of FSH from 5 to 100 mIU/mL.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₅)

The Calibrators are ready to use, are calibrated against the International Standard WHO 2nd IRP 78/549 and have the following concentration:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
mIU/mL	0	5	10	25	50	100

For sample with concentration over 100 mIU/mL dilute the sample 1:2 with the Calibrator 0.

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2÷8°C.

6.2. Preparation of the Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "10X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2÷8°C.

In concentrated wash solution is possible to observe the presence of crystals, in this case mix at room temperature until complete dissolution of crystals; for greater accuracy dilute the whole content of the bottle of concentrated wash solution to 500 mL, taking care also to transfer crystals completely, then mix until crystals are completely dissolved.

6.3. Preparation of the sample

The specimens should be human serum or plasma.

Note: it is recommended to avoid the use of EDTA-plasma, because it could interfere with the sample assay.

The usual precautions in the collection of venipuncture samples should be observed.

For accurate comparison to established normal values, a fasting morning serum sample should be obtained.

To obtain the serum, the blood should be collected in a venipuncture tube without additives or anti-coagulants; allow the blood to clot; centrifuge the specimen to separate the serum from the cells.

Samples may be refrigerated at 2÷8°C for a maximum period of 5 days. If the specimens cannot be assayed within this time, the samples may be stored at -20°C for up to 30 days. Avoid repetitive freezing and thawing.

When assayed in duplicate, 0.100 mL of the specimen is required.

6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the

calibration curve (C₀-C₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Control	Blank
Sample /Control		50 µL	
Calibrator C ₀ -C ₅	50 µL		
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at room temperature (22-28°C) for 1 hours. Remove the contents from each well. Wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22-28°C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at levels of a low, normal, and high range for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

If computer controlled data reduction is used to calculate the results of the test, it is imperative that the predicted values for the calibrators fall within 10% of the assigned concentrations.

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (E_m) for each point of the calibration curve (C₀-C₅) and of each sample.

8.2. Calibration Curve

Plot the mean value of absorbance (E_m) of the calibrators (C₀-C₅) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the calibration curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in mIU/mL.

9. EXPECTED VALUES

Reference ranges are reported below:

	FSH (mIU/mL)
MALE	1 – 14
FEMALE:	
Follicular phase	3 – 12
Mid-cycle	8 – 22
Luteal phase	2 – 12
Menopausal	35 – 151

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a “normal” population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- **For diagnostic purposes FSH values should be used as an adjunct to other data available to the physician.** Procedural directions must be followed exactly and careful technique must be used to obtain valid results. Any modification of the procedure is likely to alter the results. FSH is dependent upon diverse factors other than pituitary homeostasis. Thus, the determination of FSH alone is not sufficient to assess clinical status.
- FSH is suppressed by estrogen but in woman taking contraceptives the level may be low or normal. Excessive dieting and weight loss may lead to low gonadotropin concentration.
- Patients specimens with abnormally high FSH levels can cause a hook effect, that is, paradoxical low absorbance results. If this is suspected, dilute the specimen 1:100 with the Calibrator 0, re-assay (multiply the result by 100). However, values as high as 2000 mIU/mL have been found to absorb greater than the absorbance of the highest calibrator.
- Patients receiving preparations of mouse monoclonal antibodies for diagnosis of therapy may contain human anti-mouse antibodies (HAMA) and may show either falsely elevated or depressed values when assayed.

11. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

11.1. Precision

11.1.1. Intra-Assay

Within-run precision was determined by replicate (20x) the measurement of three different control sera in one assay. The within-assay variability is $\leq 9.7\%$.

11.1.2. Inter-Assay

Between-run precision was determined by replicate (10x) the measurement of three different control sera in different lots of kits. The between-assay variability is $\leq 8.0\%$.

11.2. Correlation

Diametra FSH kit (Y) was compared to a commercially available FSH kit (X). 35 serum samples have been tested. The linear regression curve was:

$$Y = 0.91 \cdot X + 3.41$$

$$r^2 = 0.969$$

The new Diametra FSH kit (Y) was compared to the previous Diametra FSH kit (X): 60 serum samples have been tested. The linear regression curve was:

$$Y = 1.01 \cdot X - 0.44$$

$$r^2 = 0.953$$

11.3. Sensitivity

The minimal detectable concentration of FSH that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.17 mIU/mL.

11.4. Specificity

The cross-reactivity of the Diametra FSH ELISA method to selected substances was evaluated by adding the interfering substance to a serum matrix at various concentrations. The cross-reactivity was calculated by deriving a ratio between dose of interfering substance to dose of Follicle Stimulating Hormone needed to produce the same OD.

Substance	Concentration	Cross Reactivity
FSH	---	100,0%
HCG	5000 mIU/mL	N.D.
LH	400 mIU/mL	N.D.
Prolactin	2000 ng/mL	N.D.
TSH	1000 mIU/L	N.D.

11.5. Accuracy

Three different samples were spiked with 3, 6, 12 and 24 mIU/mL of FSH; the recovery test showed an average value ($\pm$ SD) of $97.83\% \pm 8.52\%$.

Three different samples were diluted 2, 4 and 8 times with the Calibrator 0; the dilution test showed an average value ($\pm$ SD) of $105.54\% \pm 5.36\%$.

12. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

- Odell, W.D., Parlow, A.F., et al, *J Clin Invest*, 47, 2551(1981).
- Saxema, B.B., Demura, H.M., et al, *J Clin Endocrinol Metab.*, 28, 591 (1968).
- Wennink JM, Delemarre-van de Waal HA, Schoemaker R, Schoemaker H, Schoemaker J. 1990 Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone secretion patterns in girls throughout puberty measured using highly sensitive immunoradiometric assays. *Clin Endocrinol (Oxf)* 33:333–344.
- Winter JS, Faiman C. 1973 The development of cyclic pituitarygonadal function in adolescent females. *J Clin Endocrinol Metab.* 37:714–718.
- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E 1997 The follicle stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 18:739–773.
- Vitt UA, Kloosterboer HJ, Rose UM, Mulders JW, Kiesel PS, Bete S, Nayudu PL 1998 Isoforms of human recombinant folliclestimulating hormone: comparison of effects on murine follicle development *in vitro*. *Biol Reprod* 59:854–861.
- Layman LC, Lee EJ, Peak DB, Namnoum AB, Vu KV, van Lingen BL, Gray MR, McDonough PG, Reindollar RH, Jameson JL 1997 Delayed puberty and hypogonadism caused by mutations in the follicle-stimulating hormone β subunit gene. *N Engl J Med* 337:607–611.
- Robertson DR 1991 Circulating half-lives of follicle stimulating hormones and luteinizing hormone in pituitary extracts and isoform fractions of ovariectomized and intact ewes. *Endocrinology* 129:1805–1813.
- Wide L 1981 Electrophoretic and gel chromatographic analyses of follicle stimulating hormone in human serum. *Ups J Med Sci* 86:249–258.
- Berger P, Bidart JM, Delves PS, Dirnhofer S, Hoermann R, Isaacs N Jackson A, Klonisch T, Lapthorn A, Lund T, Mann K, Roitt I, Schwarz S, Wick G 1996 Immunochemical mapping of gonadotropins. *Mol Cell Endocrinol* 125:33–43.

Ed. 01/2015

DCM010-13

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM010-13
Ed. 01/2015

FSH ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de la hormona estimulante del folículo (FSH) en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C 8°C



Σ = 96 ensayos

REF DKO010

USO PREVISTO

El kit FSH ELISA Diametra es un método inmunoenzimático directo en fase sólida para la determinación cuantitativa de la hormona estimulante del folículo (FSH) en suero o plasma humano.

El kit FSH ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. IMPORTANCIA CLÍNICA

La hormona estimulante del folículo (FSH) es una glicoproteína compuesta por 2 subunidades con una masa molecular de aproximadamente 35,500 dalton. La subunidad α es similar a la de las otras hormonas pituitarias [hormona luteinizante (LH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y gonadotropina coriónica (HCG)], mientras que la subunidad β es única. La subunidad β confiere a la molécula la actividad biológica. La estimulación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) provoca las liberaciones de FSH y LH de la glándula pituitaria, y estas son transportadas por la sangre a los lugares donde actúan, es decir, los testículos y los ovarios.

En los hombres, la FSH actúa en las células de Sertoli de los testículos, estimulando la síntesis de inhibina, que parece inhibir específicamente una secreción posterior de FSH y de la proteína de unión de andrógenos. Por lo tanto, indirectamente promueve la espermatogénesis. En las mujeres, la FSH actúa en las células granulosas de los ovarios, estimulando la esteroidogénesis. Todos los ciclos menstruales con ovulación tienen una secuencia característica de secreción de FSH y LH. El ciclo menstrual se divide en fase folicular y fase lútea por el impulso que se produce en la mitad del ciclo de las gonadotropinas (LH y FSH). Con el avance de la fase folicular, la concentración de FSH disminuye. Al aproximarse el momento de la ovulación, aproximadamente a la mitad del ciclo, la FSH alcanza el nivel máximo (con una entidad menor que la LH). La utilidad clínica de la determinación de la hormona estimulante del folículo (FSH) en la evaluación de la homeostasis de la regulación de la fertilidad a través del eje hipotálamico-pituitario-gonadal ha sido ampliamente demostrada (1,2).

2. PRINCIPIO DEL ENSAYO

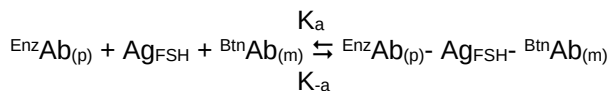
Los reactivos esenciales requeridos para el ensayo inmunoenzimático incluyen anticuerpos con alta

afinidad y especificidad (conjugados con enzima e inmovilizados) con reconocimiento de epítomos distintos, en exceso, y antígeno nativo.

En este procedimiento, la inmovilización se produce durante el ensayo en la superficie de los pocillos de la microplaca mediante la interacción de la estreptavidina fijada en los pocillos y el anticuerpo anti-LH biotinilado añadido.

Mezclando el anticuerpo biotinilado, el anticuerpo conjugado con enzima y un suero que contiene el antígeno nativo, se produce la reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos, sin competencia o impedimento estérico, para formar un complejo sándwich soluble.

La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:



$\text{BtAb}_{(m)}$ = anticuerpo biotinilado monoclonal (cantidad en exceso)

Ag_{FSH} = antígeno FSH nativo (cantidad variable)

$\text{EnzAb}_{(p)}$ = anticuerpo policlonal marcado con enzima (cantidad en exceso)

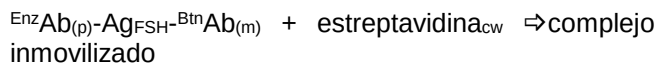
$\text{EnzAb}_{(p)} - \text{Ag}_{\text{FSH}} - \text{BtAb}_{(m)}$ = complejo sándwich antígeno-anticuerpos

K_a = constante de asociación

K_{-a} = constante de disociación

Al mismo tiempo, el complejo se fija en el pocillo mediante la reacción de alta afinidad de la estreptavidina y el anticuerpo biotinilado.

Esta interacción se describe a continuación:



$\text{Estreptavidina}_{\text{cw}}$ = estreptavidina inmovilizada en el pocillo

Complejo inmovilizado = complejo sándwich antígeno-anticuerpos

Tras lograr el equilibrio, la fracción de antígeno unida al anticuerpo se separa del antígeno libre mediante un lavado.

La actividad enzimática de la fracción unida es directamente proporcional a la concentración de antígeno nativo.

Usando distintos sueros de referencia con valores conocidos de antígeno se puede generar una curva dosis-respuesta con la que se puede determinar la concentración del antígeno de muestras desconocidas.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1 Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (6 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0	REF	DCE002/1006-0
CAL1	REF	DCE002/1007-0
CAL2	REF	DCE002/1008-0
CAL3	REF	DCE002/1009-0
CAL4	REF	DCE002/1010-0
CAL5	REF	DCE002/1011-0

2. Control (1 frasco, 1 mL)

La concentración del Control se indica en el certificado de calidad (Certificate of Analysis)

REF DCE045/1003-0

3. Conjugado (1 frasco, 12 mL)

Anticuerpo anti FSH conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)

Anticuerpo anti FSH biotilnilado

REF DCE002/1002-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Estreptavidina absorbida en la microplaca

REF DCE002/1003-0

5. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H₂O₂-TMB 0,26 g/L (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004-0

6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

7. Solución de lavado conc. 10X (1 frasco, 50 mL)

Tampón fosfato 0.2M pH 7.4

REF DCE054-0

3.2 Reactivos necesarios no incluidos en el kit

Agua destilada

3.3 Material e instrumental auxiliar

Dispensadores automáticos

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

Notas

Conservar los reactivos a oscuras, a temperatura entre 2 y 8°C.

Llevar a temperatura ambiente la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) antes de abrirla; cerrarla de inmediato después de sacar las tiras que se han de utilizar; una vez abierta, la microplaca se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de FSH de 5 mIU/mL a 100 mIU/mL.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese

el orden de dispensación. si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.

- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de Parada. Tanto el sustrato como la solución de Parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C₀...C₅)

Los Calibradores son listos para usar, son calibrados frente al Estándar Internacional WHO 2^a IRP 78/549, y tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
mIU/mL	0	5	10	25	50	100

Para muestras con una concentración superior a 100 mIU/mL, diluir la muestra 1:2 con el Calibrador 0. Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8°C.

6.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de "Solución de lavado conc. 10X" con agua destilada hasta un volumen de 500 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:10. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8°C durante al menos 30 días.

En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada a 500 mL, teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

6.3. Preparación de la muestra

Usar muestras séricas o plasmáticas.

Nota: no se recomienda el uso de EDTA-plasma, ya que puede interferir con el ensayo.

Observar las precauciones habituales en la toma de muestras obtenidas por vía venosa.

Obtener las muestras de suero por la mañana y en ayunas para una comparación precisa que permita establecer valores normales.

Para obtener el suero, la sangre debe recogerse en un tubo de extracción por vía venosa, sin aditivos ni anticoagulantes; dejar que la sangre se coagule; centrifugar la muestra para separar el suero de las células.

Las muestras pueden conservarse a una temperatura de 2-8°C durante un período máximo de 5 días. Si no

se van a usar en este período, pueden conservarse a una temperatura de -20°C durante 30 días como máximo. No volver a congelar las muestras una vez descongeladas.

Si el ensayo se realiza por duplicado, se requieren 0,100 mL de la muestra.

6.4. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivos	Calibrador	Muestras /Control	Blanco
Muestras /Control		50 µL	
Calibrador C ₀ -C ₅	50 µL		
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incubar 1 h a temperatura ambiente (22-28°C). Retirar la mezcla de reacción. Lavar los pocillos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22÷28°C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.			

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar los controles internos a niveles de los rangos bajo, medio y alto para supervisar el rendimiento del ensayo. Estos controles deben tratarse como muestras desconocidas y sus valores deben determinarse en cada procedimiento de ensayo realizado.

Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos pertinentes para determinar las tendencias. Desviaciones significativas del rendimiento establecido pueden indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. RESULTADOS

8.1. Absorbancia media

Calcular la extinción media (E_m) de cada punto de la curva de calibración (C_0 - C_5) y de cada muestra.

8.2. Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia en función de las concentraciones de los calibradores (C_0 - C_5). Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

8.3. Cálculo de los resultados

Interpolarse del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en mIU/mL.

9. VALORES ESPERADOS

Los intervalos de referencia se indican en la siguiente tabla:

	FSH (mIU/mL)
HOMBRES	1 – 14
MUJERES:	
Fase folicular	3 – 12
Fase ovulatoria	8 – 22
Fase lútea	2 – 12
Menopausia	35 – 151

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- **Para uso diagnóstico considerar los valores de FSH junto con otros datos disponibles para el médico.** Seguir las notas de procedimiento y realizar el ensayo con cuidado para obtener resultados válidos. Cualquier modificación del procedimiento podría alterar los resultados. La FSH depende de varios factores distintos de la homeostasis pituitaria. Por lo tanto, la determinación de FSH por sí sola no puede proporcionar un cuadro clínico completo del estado del paciente.
- La hormona FSH es suprimida por los estrógenos, pero en mujeres que toman anticonceptivos orales, los niveles pueden ser bajos o normales. Dietas demasiado radicales y pérdidas de peso pueden reducir la concentración de gonadotropina.
- En muestras de pacientes con niveles altos de FSH se puede producir el efecto gancho, por lo que pueden presentar paradójicamente valores bajos de absorbancia. Se recomienda diluir 1:100 con el calibrador 0 y volver a medir (multiplicar el resultado por 100). Sin embargo, se ha observado que valores de hasta 2000 mIU/mL han tenido una absorbancia mayor que la del calibrador más alto.
- Los pacientes que reciben preparaciones de anticuerpos monoclonales murinos para el diagnóstico de la terapia pueden presentar anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) y, por lo tanto, dar resultados falsos positivos o falsos negativos.

11. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

11.1. Precisión

11.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (20x) la medición de tres sueros de control distintos en una única sesión de análisis. La variabilidad intraensayo es $\leq 9,7\%$.

11.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es $\leq 8,0$.

11.2. Correlación

El kit FSH (Diametra) se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 35 muestras de suero.

La curva de regresión es:

$$\text{Diametra} = 0,91 * (\text{ensayo comercial}) + 3,41$$
$$r^2 = 0,969$$

El kit FSH Diametra (Y) se ha comparado con el kit FSH Diametra del método anterior (X). Se probaron 60 muestras de suero.

La curva de regresión es la siguiente:

$$Y = 1,01 * X - 0,44$$
$$r^2 = 0,953$$

11.3. Sensibilidad

La concentración mínima de FSH medible que puede ser distinta del Calibrador 0 es 0,17 mIU/mL.

11.4. Especificidad

La reactividad cruzada del kit FSH Diametra a las sustancias potencialmente interferentes se estimó mediante la adición de estas sustancias, en concentraciones diferentes, a una matriz de suero. La reactividad cruzada se calculó evaluando la relación entre la concentración de la sustancia interferente y la concentración de FSH necesaria para producir la misma DO.

Sustancia comprobada	Reactividad cruzada	Concentración
FSH	100,0%	---
HCG	N.D.	5000 mIU/mL
LH	N.D.	400 mIU/mL
Prolactin	N.D.	2000 ng/mL
TSH	N.D.	1000 mIU/L

11.5. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en una muestra enriquecida con 3 – 6 – 12 – 24 mIU/mL de FSH ha dado un valor medio ($\pm$ DE) de 97.83% $\pm$ 8.52%.

La prueba de dilución conducta en tres muestras diluidas 2 - 4 - 8 veces con Calibrador 0 dio una media ($\pm$ DE) de 105.54% $\pm$ 5.36%.

12. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

- Odell, W.D., Parlow, A.F., et al, *J Clin Invest*, 47, 2551 (1981).
- Saxema, B.B., Demura, H.M., et al, *J Clin Endocrinol Metab.*, 28, 59 (1968).
- Wennink JM, Delemarre-van de Waal HA, Schoemaker R, Schoemaker H, Schoemaker J. 1990 Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone secretion patterns in girls throughout puberty measured using highly sensitive immunoradiometric assays. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 33:333–344.
- Winter JS, Faiman C. 1973 The development of cyclic pituitarygonadal function in adolescent females. *J Clin Endocrinol Metab*. 37:714–718.
- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E 1997 The follicle stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 18:739–773.
- Vitt UA, Kloosterboer HJ, Rose UM, Mulders JW, Kiesel PS, Bete S, Nayudu PL 1998 Isoforms of human recombinant folliclestimulating hormone: comparison of effects on murine follicle development *in vitro*. *Biol Reprod* 59:854–861.
- Layman LC, Lee EJ, Peak DB, Namnoum AB, Vu KV, van Lingen BL, Gray MR, McDonough PG, Reindollar RH, Jameson JL 1997 Delayed puberty and hypogonadism caused by mutations in the folliclestimulating hormone β subunit gene. *N Engl J Med* 337:607–611.
- Robertson DR 1991 Circulating half-lives of follicle stimulating hormones and luteinizing hormone in pituitary extracts and isoform fractions of

ovariectomized and intact ewes. *Endocrinology* 129:1805– 1813.

- Wide L 1981 Electrophoretic and gel chromatographic analyses of follicle stimulating hormone in human serum. *Ups J Med Sci* 86:249–258.
- Berger P, Bidart JM, Delves PS, Dirnhofer S, Hoermann R, Isaacs N, Jackson A, Klonisch T, Laphorn A, Lund T, Mann K, Roitt I, Schwarz S, Wick G 1996 Immunochemical mapping of gonadotropins. *Mol Cell Endocrinol* 125:33–43.

Ed. 01/2015

DCM010-13

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15

20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14, 06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Estable hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso		DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes		DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Limitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação		DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING**ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS

No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'essai

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs