

# Gonadotropin FSH kit

ELISA Testkit zur quantitativen Bestimmung  
des follikelstimulierenden Hormons in humanem  
Blutserum

*(Gebrauchsanweisung: Seite 3)*

Enzyme immunoassay for quantitative determination  
of follicle-stimulating hormone in human serum

*(Instructions for use: page 28)*

Manueller Test / Manual test

*Abschnitt / Section 13*

Automatisierter Test / Automated test

*Abschnitt / Section 14*



Gonadotropin FSH Kit  
(Manueller Test)



96 Untersuchungen  
96 tests

21-06



Gonadotropin FSH kit  
(manual test)

Gonadotropin FSH Kit  
(Automatisierter Test für  
"Alisei")













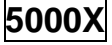










96 Untersuchungen  
96 tests

21-06 A



Gonadotropin FSH kit  
(automated test for "Alisei")

# 1.KENNZEICHEN / SYMBOLS LEGEND

	In-vitro Diagnostika In vitro diagnostic medical device		EG-Konformitätserklärung EC Declaration of conformity
	Bestellnummer Catalogue number		Chargenbezeichnung Batch code
	Verwendbar bis Use by		Hersteller Manufacturer
	Herstellungsdatum Date of manufacture		Gebrauchsanweisung beachten Consult operating instructions
	Temperaturbegrenzung Temperature limitation		Biogefährdung Biological risks
	Trial-Lösung, 5000x konzentriert		Ausreichend für <n> Prüfungen
	Trial, 5000X concentrated		Contains sufficient for <n> tests
	Beschichtete Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) Coated microplate (96 wells)		Konjugat Conjugate
	Waschlösung, 20x konzentriert		Substrat Substrate
	Wash solution, 20X concentrated		
	Kalibratoren Calibrators		Stopplösung Stop solution
	Kontrolle Control		Deionisiertes, destilliertes Wasser
	Auflösen mit angegebenem Volumen Reconstitute with specified volume of liquid		Deionized or distilled water Optische Dichte
	Reizend Irritant		Optical density

**Warning**

## 2. VERWENDUNGSZWECK

Der **Gonadotropin FSH Testkit** wird für die **quantitative** Bestimmung des **follikelstimulierenden Hormons (FSH)** in humanem Blutserum verwendet.

Der Testkit ist in zwei Variationen erhältlich:

**REF 21-06** Für den manuellen Gebrauch;

**REF 21-06 A** Für den Gebrauch mit ELISA-Automat "Alisei", hergestellt durch die Firma Next Level S.r.l.

Die Gebrauchsanweisungen befinden sich:

Abschnitt 13 Manueller Test;

Abschnitt 14 Automatisierter Test "Alisei".

**Anmerkung 1:** *Die Konzentrationswerte der Kalibratoren können bei manuellem und automatisiertem Testkit variieren.*

**Anmerkung 2:** *Wir garantieren verlässliche Testergebnisse bei folgender Anwendung der Testkit:*

**REF 21-06 A** nur für ELISA-Automat "Alisei";

**REF 21-06** nur für den manuellen Gebrauch.

*Bei Verwendung einer nicht vordefinierten Methode ist der Anwender dafür verantwortlich, sicherzustellen, dass diese für ELISA-Kits angemessen getestet wurde.*

FSH ist ein Glykoprotein mit einer Molekularmasse von circa 30 000 Da. Es besteht aus den zwei Untereinheiten Alpha und Beta. FSH wird im Hypophysenvorderlappen gebildet.

Bei Männern wird FSH neben dem luteinisierenden Hormon (LH) und Testosteron zur Unterstützung der Spermatogenese in den Hodenkanälchen gebraucht.

Bei Frauen stimuliert FSH das Wachstum und Reifen der Follikel in den Eierstöcken.

Eine erhöhte FSH-Konzentration wird bei Patienten mit verschiedenen Hypogonadismusarten (primäre Eierstockinsuffizienz, Polyzysten der Eierstöcke, Menopause usw.), bei Nierenversagen und Zirrhose sowie nach Sterilisation des Mannes festgestellt.

Bei malignen Hodentumoren wird meistens eine Reduzierung der FSH-Konzentration nachgewiesen.

Die quantitative Bestimmung der FSH-Konzentration hat eine diagnostische Bedeutung zur Feststellung der Menopause, Bestimmung der genauen Ovulationszeit und dem Monitoring von endokrinen Therapien.

### 3. TESTPRINZIP

Der **Gonadotropin FSH Testkit** ist ein "Sandwich"-Typ des Festphasen-Enzymimmunoassay, basierend auf zwei monoklonalen Antikörpern, die spezifisch an unterschiedliche Epitope der FSH- $\beta$ -Untereinheit binden. Einer dieser Antikörper ist mit der Meerrettich Peroxidase (HRP) konjugiert, der zweite ist an die Innenfläche der Kavität gebunden.

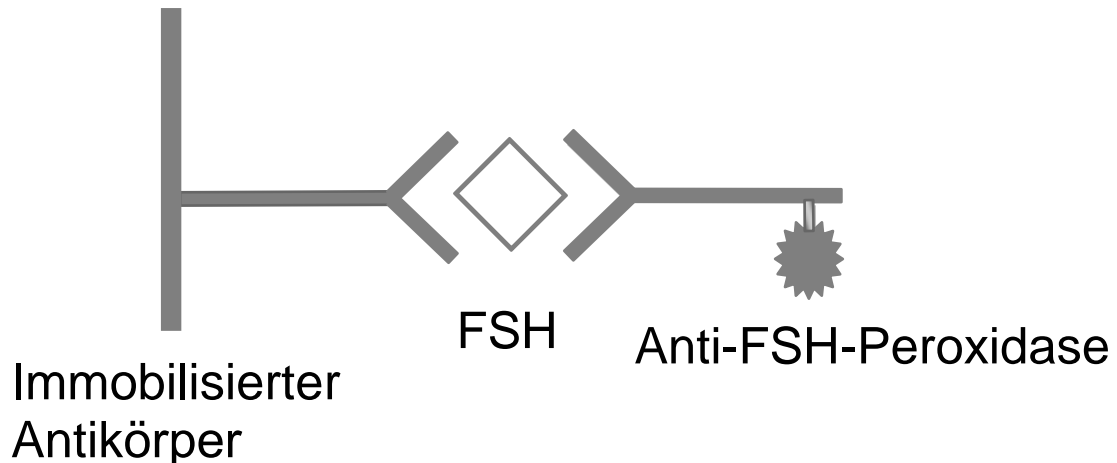
Die FSH-Moleküle der Blutserumprobe binden sowohl den immobilisierten Antikörper als auch das Anti-FSH-Peroxidase-Konjugat (Abb. 1).

Beim Waschen der Kavitäten mit der Waschlösung werden alle ungebundenen Komponenten entfernt. Die Menge des gebundenen Konjugates ist direkt proportional zur FSH-Konzentration der zu testenden Probe.

Während der Inkubation mit der TMB-Lösung entwickelt sich eine Farbreaktion.

Die Intensität der Färbung korreliert mit der FSH-Menge der Probe oder der Kalibratoren.

Die FSH-Konzentration in der Patientenprobe wird mit einer Standardkurve, die mit dem Testkit erarbeitet wird, ausgelesen.



*Abb.1 Testschema*

#### 4. LAGERUNG UND STABILITÄT DES TESTKITS

Das Verfallsdatum des kompletten Testkits ist auf dem Außenetikett angegeben; das Verfallsdatum jeder einzelnen Testkomponente ist auf dem jeweiligen Etikett angegeben.

Der **Gonadotropin FSH Testkit** ist nach dem Empfang und bis zur Verwendung bei  $+2...+8^{\circ}\text{C}$  in der Originalverpackung des Herstellers zu lagern. Eine Lagerung bei Temperaturen bis  $+25^{\circ}\text{C}$  ist maximal für 5 Tage zulässig. Die Haltbarkeitsdauer des Kits beträgt 18 Monate.

Nach dem Öffnen ist der Testkit bei einer Lagerung von  $+2...+8^{\circ}\text{C}$  bis zu 12 Monate haltbar

Wenn der Testkit in mehreren getrennten Experimenten verwendet wird, ist der Inhalt nach dem Öffnen wie folgt zu lagern aber die Komponenten dürfen nie länger als bis zu ihrem Ablaufdatum verwendet werden::

- Die ungenutzten Mikrotiterplatten-Streifen: in einem fest verschlossenen Druckverschlussbeutel, konzentrierte Waschlösung und Stopplösung bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Fläschchen mit Konjugat, Kalibratoren und Kontrolle (gebrauchsfertig): bei +2...+8 °C für 12 Monate; Fläschchen mit Kalibratoren und Kontrolle (gelöst aus Lyophilisat): bei +2...+8 °C für maximal 6 Monate nach dem Öffnen;
- Fläschchen der konzentrierten Trial-Lösung, des Waschlösungskonzentrats und der Stopplösung: bei +2...+8°C bis zum Verfallsdatum;
- Fläschchen mit Substrat-Lösung: bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum, **lichtgeschützt**;
- Gebrauchsfertige Waschlösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) für maximal 5 Tage oder bei +2...+8 °C für 4 Wochen;
- Gebrauchsfertige Trial-Lösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) für maximal 5 Tage.

### **Beschädigte Testkits**

Im Falle einer schweren Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss Astra Biotech GmbH schriftlich innerhalb einer Woche nach dem Empfang der Ware informiert werden. Der Gebrauch stark beschädigter Komponenten für einen Testlauf wird nicht empfohlen.

## **5. PROBENGWINNUNG UND -LAGERUNG**

Blut durch Venenpunktion entnehmen. Nach der Gerinnung wird das Serum durch Zentrifugation abgetrennt.

Es ist nicht zulässig, für eine Analyse Blutplasma, hämolysiertes (hell rot) oder lipämisches (milchig) Serum sowie Natriumazid-haltige Serumproben zu benutzen.

Die Proben sind bei +2...+8 °C nicht länger als 5 Tage zu lagern.

Bei Notwendigkeit einer dauerhaften Aufbewahrung wird empfohlen, die Probe zu aliquotieren und bei einer Temperatur von  $\leq -20$  °C gefroren zu lagern. Ein wiederholtes Einfrieren ist zu vermeiden.

## 6. REFERENZWERTE

Mit Hilfe des **Gonadotropin FSH Testkits** wurden Blutserumproben, die vormittags zwischen 9 und 11 Uhr bei gesunden Blutspendern im Alter zwischen 19 und 65 Jahren, entnommen wurden, untersucht. Die ermittelten FSH-Konzentrationswerte sind in folgender Tabelle dargestellt. Der angegebene Bereich dient jedoch nur als eine Orientierungshilfe.

Es wird ausdrücklich empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Referenzbereich für die FSH–Normkonzentrationen bestimmt.

<b>Gruppe</b>	<b>n</b>	<b>Mittelwert (mIU/ml)</b>	<b>Bereich (mIU/ml)</b>
<i>Frauen</i>			
Mit normalem Menstruationszyklus (19–35 Jahre)	120		
Follikelphase		4,6	1,8-11,3
Zyklusmitte		7,9	4,9-20,4
Lutealphase		3,3	1,1-9,5
Postmenopause (49–65 Jahre)	15	68,4	31,0-130
<i>Männer (21–39 Jahre)</i>	40	3,9	1,0-11,8

## 7. QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, Kontrollproben entsprechend der nationalen und regionalen Vorschriften zu benutzen. Der Einsatz der Kontrollproben sichert die Tag-zu-Tag Gültigkeit der Ergebnisse.

## 8. REAGENZIVORBEREITUNG

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) gebracht und gründlich gemischt werden.

### **MP Mikrotiterplatte**

Die Verpackung mit der **Mikrotiterplatte** vor dem Öffnen mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur lagern und anschließend wie folgt vorbereiten:

Notwendige Anzahl der Streifen in den Rahmen einsetzen. Die unbenutzten Streifen in einen Druckverschlussbeutel legen und gut verschließen.

### **CAL CONTROL Kalibratoren und Kontrolle**

Flüssige Kalibratoren und die flüssige Kontrolle sind gebrauchsfertig. Die lyophilisierten Kalibratoren und die Kontrolle wie folgt vorbereiten:

Durch leichtes Klopfen auf den Deckel wird der Feststoff vom Flaschenrand gelöst. Die Fläschchen werden vorsichtig geöffnet und die Deckelkappen umgedreht auf eine trockene und saubere Oberfläche gelegt. 0,5 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser wird jeweils in die lyophilisierten Kalibratoren und Kontrolle pipettiert, diese wieder mit



jeweiligem Deckel verschlossen und 10 Minuten bei Raumtemperatur ohne Mischen inkubiert.

Danach unter Vermeidung einer Schaumbildung sorgsam rühren bis der Feststoff komplett gelöst ist.

Weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur unter periodischem Schütteln inkubieren. Es darf kein Feststoff im Deckel oder an den Wänden der Fläschchen zurückbleiben.

**WASH P** Zubereitung der benötigten Menge der Waschlösung durch 20fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem Wasser:

5 ml **WASH P** **20X** + 95 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

**SUB** **Substrat** vor direktem Licht schützen.

## 9. PROBENVORBEREITUNG

Proben auf Raumtemperatur bringen und sorgfältig mischen, um Homogenität zu erreichen.

## 10. TESTCHARAKTERISTIKA

### 10.1 Kalibrierung:

Der **Gonadotropin FSH** Testkit wurde gegen das zweite internationale Referenz-Präparat WHO 78/549 kalibriert.

## 10.2 Spezifität:

Gemäß den Spezifikationen des Lieferanten beträgt die Kreuzreaktion der beiden monoklonalen Antikörper: mit hCG – weniger als 0,1%; mit TSH – weniger als 3,5% und mit LH – weniger als 1,5%.

## 10.3 Analytische Sensitivität:

Die analytische Sensitivität des **Gonadotropin FSH Testkits**, d.h. die minimale Konzentration, die sich vom Kalibrator 0 sicher unterscheiden lässt, beträgt 0,25 mIU/ml. Zur Ermittlung wurde der Mittelwert einer 10fach-Bestimmung der OD des Kalibrators 0 unter Berücksichtigung der Standardabweichung (+2 SD) gebildet.

## 10.4 Messbereich:

Die **Gonadotropin FSH Testkits** (manuelles und Alisei Testkit) sind validiert für die Detektion einer FSH-Konzentration (unverdünnt) innerhalb eines Bereiches von 0,25-100 mIU/ml.

## 10.5 High-Dose-Hook-Effekt:

Der High-Dose-Hook-Effekt wurde durch Aufstocken der Kalibratormatrix mit Antigen ermittelt. Der **High-Dose-Hook-Effekt** wurde bis zu einer FSH-Konzentration von 50 000 mIU/ml nicht nachgewiesen.

## 10.6 Intra-Assay und Inter-Assay Varianz:

Um einen **Intra-Assay** Variationskoeffizienten festzulegen, wurden 8 Blutserumproben, jeweils in 9fach-Bestimmung untersucht. Die Testresultate sind in der Tabelle dargestellt:

### Manuelles Testkit

Probe	Mittlere FSH-Konzentration, mIU/ml	Intra-Assay VK	
		SD	VK, %
1	3,0	0,23	7,7
2	2,7	0,1	3,7
3	5,5	0,1	1,8
4	5,8	0,1	1,7
5	9,7	0,2	2,1
6	56,6	1,0	1,8
7	84,1	1,4	1,7
8	3,0	0,23	7,7

### Alisei Testkit

Probe	Mittlere FSH-Konzentration, mIU/m	Intra-Assay VK	
		SD	VK, %
1	2,0	0,14	7,2
2	4,5	0,19	4,1
3	8,8	0,29	3,3
4	15,4	1,13	7,3
5	21,9	1,27	5,8
6	44,4	2,30	5,2
7	60,3	1,58	2,6
8	84,7	3,67	4,3

Um einen **Inter-Assay** Variationskoeffizient festzulegen, wurden 8 Blutserumproben dreimal mit einem Intervall von einer Woche von verschiedenen Anwendern untersucht. Jede Probe wurde 9 Mal gemessen. Die Testergebnisse sind in der Tabelle dargestellt:

### Manuelles Testkit

Probe	Mittlere FSH-Konzentration, mIU/ml			Inter-Assay VK	
	1. Test	2. Test	3. Test	SD	VK, %
1	5,2	5,8	4,9	0,46	8,6
2	6,2	5,9	6,0	0,15	2,5
3	8,0	7,3	8,2	0,47	6,0
4	10,6	11,2	10,8	0,31	2,8
5	15,5	15,9	14,9	0,50	3,3
6	25,3	24,9	25,5	0,31	1,2
7	59,5	57,9	59,9	1,06	1,8
8	90,3	95,6	88,9	3,53	3,9

### Alisei Testkit

Sample	Mittlere FSH-Konzentration, mIU/ml			Inter-Assay VK	
	1. Test	2. Test	3. Test	SD	VK, %
1	2,0	2,3	2,1	0,15	7,2
2	4,5	4,1	3,9	0,30	7,3
3	8,8	8,9	9,2	0,21	2,3
4	15,4	13,9	14,6	0,75	5,1
5	21,9	20,1	21,6	0,96	4,5
6	44,4	47,2	42,6	2,32	5,2
7	60,3	56,8	59,4	1,82	3,1
8	84,7	85,3	88,1	1,81	2,1

## 11. GRENZEN DER METHODE





Eine klinische Diagnose sollte nicht allein mit Hilfe der Ergebnisse einer einzelnen diagnostischen Methode erhoben werden. Zur Diagnosestellung sollten vom Arzt alle verfügbaren klinischen und Laborbefunde berücksichtigt werden.

## 12. VORSICHTSMAßNAHMEN

- **Der Testkit ist ausschließlich zum in vitro–Gebrauch bestimmt.** Um zuverlässige Testergebnisse zu erhalten, ist die Arbeitsanleitung strikt einzuhalten. Diese Gebrauchsanweisung ist nur für den vorliegenden Testkit mit dem aufgeführten Inhalt gültig. Jeglicher Austausch der Kitkomponenten ist durch die CE-Regularien nicht gestattet.
- Der Testkit oder einzelne Kit-Komponenten dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Die vorn angegebene Haltbarkeit der verdünnten Komponenten muss ebenfalls berücksichtigt werden.
- Das Mischen oder die gleichzeitige Verwendung von Reagenzien verschiedener Testchargen, ausgenommen TMB-, Stopp- und Waschlösung, ist nicht gestattet.
- TMB-, Stopp- und Waschlösung anderer Hersteller nicht verwenden.
- Nur “P”-gekennzeichnete Astra Biotech-Waschlösung benutzen.
- Die Stopplösung ist eine 1 N Salzsäure (HCl–Lösung). Vermeiden Sie Haut- und Schleimhautkontakt. Bei Haut- oder Schleimhautkontakt den betroffenen Bereich mit

fließendem Wasser spülen und gegebenenfalls einen Arzt aufsuchen.

- Bitte folgende bekannte Verfahrensregeln beachten:
  - Reagenzien unmittelbar nach dem Waschen in die Kavitäten pipettieren;
  - Kontamination der Lösungen vermeiden;
  - Bei teilweiser Nutzung des Testkits nur benötigtes Volumen in ein gesonderten Behälter geben, nicht benutzte Reagenzien NICHT zurück in die ursprünglichen Original-Fläschchen füllen;
  - Direkte Sonneneinstrahlung während der Inkubation vermeiden;
  - Reagenzien in gleicher Reihenfolge pipettieren, um Unterschiede in den Reaktionszeiten zwischen den Kavitäten zu vermeiden. Die gesamte Pipettierzeit für Kalibratoren, Kontrolle und Proben darf 15 Minuten nicht überschreiten;
  - Die Temperatur der Inkubation aller immunologischer Reaktionen muss bei +37 °C liegen;
  - Den Boden der Kavitäten nicht berühren;
  - Kalibratoren müssen bei jedem Testlauf gemessen werden. Es wird außerdem empfohlen, die FSH-Konzentration der Kontrolle zu bestimmen.
  - Entfernen Sie die Klebeschutzfolie vorsichtig um eine Kontamination zu vermeiden und verwenden Sie dieselbe Klebeschutzfolie nicht erneut.
  
- Die TMB-Lösung sollte farblos sein. Eine helle Färbung der Lösung ist zulässig. Vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung des Substrates.

-  Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg (Hepatitis B surface Antigen) bzw. Antikörper gegen HIV (Human Immunodeficiency Virus) und HCV (Hepatitis C Virus) ein negatives Ergebnis. Dennoch kann das Vorhandensein infektiöser Erreger durch keinen Test mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien und Patienten Proben sollten deshalb immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
-  Nach dem Gebrauch werden Streifen, Kalibratoren, Kontrollen, Proben und alle Verbrauchsmittel (Reaktionsgefäße, Fläschchen, Handschuhe, Pipettenspitzen), die mit den Proben während der Bearbeitung oder Lagerung in Kontakt kamen, separat gesammelt und autoklaviert. Pipettenspitzen können anstelle des Autoklavierens durch Inkubation in desinfizierenden Substanzen sterilisiert werden. Nach der Sterilisation können alle Komponenten und Einmal-Artikel als nicht gefährlicher Müll behandelt werden. Andere Kitbestandteile werden auf konventionelle Weise entsorgt.
-  Während der manuellen Waschprozedur Überstände nicht in den Abfluss geben, sondern in einen Behälter mit Desinfektionsmittel.
-  Beim Umgang mit potentiell infektiösem Material müssen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:
  - Im Laborraum nicht rauchen, nicht trinken und nicht essen;

- Schutzhandschuhe verwenden;
  - Nie mit dem Mund pipettieren;
  - Verspritzen von Flüssigkeiten vermeiden. Sollte doch Flüssigkeit vergossen worden sein, diese sofort aufnehmen und die verschmutzte Oberfläche desinfizieren.
- Bei der Verwendung des Testkits müssen die Anforderungen der guten Laborpraxis (GLP) inklusive aller Richtlinien beachtet werden.



Der Testkit beinhaltet Reizstoffe (**CONJ**, **CAL**, **CONTROL**). Daher sollten folgende Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:

- P261 - Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden;
- P272 - Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen;
- P280 - Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen;
- P302+P352 - Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen;
- P333+P313 - Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen;
- P363 - Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen;
- P501 - Inhalt/Behälter den nationalen Vorschriften entsprechend der Entsorgung zuführen.

Die Vorsichtsmaßnahmen entsprechen der Verordnung EG Nr. 1272/2008.



## 13. MANUELLER TEST (REF 21-06)

### 13.1 Packungsinhalt

<p><b>MP</b></p>	<p><b>Mikrotiterplatte:</b> Zwölf Streifen, mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten), beschichtet mit monoklonalen FSH-Antikörpern.</p>	<p>1 Platte</p>
<p><b>CONJ</b></p>	<p><b>Konjugat:</b> Lösung aus monoklonalen Anti-FSH-Antikörpern konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP)</p>	<p>14 ml, gebrauchsfertig</p>
<p><b>0-5</b> <b>CAL</b></p>	<p><b>FSH Kalibratoren:</b> Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter FSH-Konzentration– 0; 2; 5; 25; 50; 100 mIU/ml. (ungefähre Werte - verwenden Sie die Daten nicht für die Auswertung des Assays). Die Konzentrationen der Kalibratoren können sich zwischen Protokoll 1 und 2 unterscheiden. Die exakten Lot spezifischen FSH-Konzentrationen sind im Quality Control Sheet angegeben.</p>	<p>6 Fläschchen je 0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert</p>
<p><b>CONTROL</b></p>	<p><b>FSH Kontrolle:</b> Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter FSH-Konzentration. Der Konzentrationsbereich kann sich zwischen Protokoll 1 und 2 unterscheiden. Der Lot spezifische FSH-Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben.</p>	<p>0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert</p>
<p><b>SUB</b></p>	<p><b>Substrat (TMB-Lösung):</b> 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid</p>	<p>14 ml, gebrauchsfertig</p>

<b>WASH P</b> <b>20X</b>	<b>Waschlösung, 20x konzentriert:</b> Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 560 ml Lösung.	2x14 ml, konzentriert
<b>STOP</b>	<b>Stopplösung:</b> 1 N HCl - Lösung	14 ml, gebrauchsfertig
	<b>Klebeschutzfolie</b>	2x1 Folie (optional)

### 13.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- kalibrierte, verstellbare Einkanal-Pipetten mit Einweg-Pipettenspitzen;
- kalibrierte, verstellbare 8-Kanal-Pipette mit Einweg-Pipettenspitzen;
- Mikrotiterplatten-Inkubator (+37 °C) oder Mikrotiterplatten-Inkubator-Schüttler (+37 °C, 500-800 rpm)
- Equipment zum manuellen oder automatischen Waschen
- Vortexer;
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten (450 nm);
- Messzylinder, Becherglas;
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser;
- Labor-Handschuhe;
- separate Behälter zum Pipettieren mit der 8-Kanal-Pipette;
- Desinfektionsmittel;
- Absorbierendes Material (zum manuellen Waschen).

### 13.3 TESTABLAUF

Der **Gonadotropin FSH Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller

Streifen reicht ein Testkit für eine quantitative Doppelbestimmung von 40 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und für die Bestimmung des Leerwertes (Blank = OD der TMB-Lösung).

### 13.3.1 Assay-Durchführung

**Anmerkung:** Bitte überprüfen Sie auf dem mit dem Kit gelieferten Quality Control Sheet, für welches Assay-Protokoll Ihr Kit validiert wurde. Wenn Ihr Kit für das Assay Protocol 1 validiert wurde, folgen Sie bitte dem unten beschriebenen Assay Protocol 1. Wenn Ihr Kit zusätzlich für das Assay Protocol 2 validiert wurde, beachten Sie bitte die Ergänzung 1 zu der mit dem Kit gelieferten Gebrauchsanweisung.

#### Assay-Protokoll 1

(siehe: Assay-Schema für Assay-Protokoll 1, Abschnitt 13.5)

**Anmerkung:** Dazugehörige Konzentrationen der Kalibratoren und Kontrollbereiche für das Assay-Protokoll 1 sind im Quality Control Sheet enthalten.

**Alle Proben sollten in Doppelbestimmung getestet werden.**

- A. 100 µl Konjugat [CONJ] in alle Kavitäten außer Kavitäten A1-A2 (Blank) pipettieren.**
- B. 50 µl Kalibratoren [CAL], Kontrolle [CONTROL] und die vorbereiteten Serumproben in Zweifachbestimmung in entsprechende Kavitäten pipettieren.**

**Kavitäten A1-A2 bleiben frei (Blank).**

**Anmerkung:** Die Gesamtzeit der Pipettiertschritte darf 15 Minuten nicht überschreiten, da es somit zu einer erheblichen Variation der Inkubationszeit zwischen den Proben kommt und das Testergebnis somit unzuverlässig sein kann.

**Anmerkung:** Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, nutzen sie diese jetzt um die Mikrotiterplatten zu verschließen.

**C. 60 Minuten bei +37 °C unter Schütteln (500 bis 800 rpm) inkubieren.**

**Anmerkung: Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, entfernen sie diese nun vorsichtig von der Mikrotiterplatte.**

**D. 5x, wie unten beschrieben, waschen.**

**E. 100 µl Substrat SUB in jede Kavität pipettieren. Streifen entweder bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) im Dunkeln für 15–30 Minuten (abhängig von der Farbtintensität) oder für 10 Minuten bei +37 °C unter Schütteln (500-800 rpm) inkubieren.**

**F. 100 µl Stopplösung STOP in alle Kavitäten (auch Blank) (in selber Reihenfolge und Geschwindigkeit wie das Substrat) pipettieren und für 1-2 Minuten bei Raumtemperatur schütteln.**

**G. Messen der Optischen Dichte bei 450 nm innerhalb von 20 Minuten.**

### **13.3.2. Waschen**

Es wird empfohlen, ein automatisches Mikroplatten-Waschgerät mit 5 Waschzyklen und einem jeweiligen Wasch-Volumen von 300 µl pro Kavität und Zyklus zu benutzen.

Die Waschprozedur kann ebenso manuell durchgeführt werden:

- Überstand aus den Kavitäten in einen Behälter mit Desinfektionsmittel verwerfen;
- 300 µl der vorbereiteten Waschlösung (Abschnitt 8) in jede Kavität geben, die Platte für 5 bis 10 Sekunden sorgfältig schütteln und den Überstand verwerfen. 5 Mal wiederholen;
- Ausklopfen der Kavitäten auf einer saugfähigen Unterlage bis alle Flüssigkeit entfernt ist.

### 13.4 Datenverarbeitung

Bei Benutzung eines Photometers, welcher keine Nullstellung erlaubt, wird der OD-Wert der Kavitäten A1-A2 (=Blank) von allen anderen OD-Werten vor weiterer Kalkulation subtrahiert. *Beispiel:*

OD (Kalibrator 5) gemessen = 2,28 und OD (Blank) = 0,06;  
 OD (Kalibrator 5) berechnet =  $2,28 - 0,06 = \underline{\underline{2,22}}$ .

#### 13.4.1 Datenverlässlichkeit (OD<sub>450 nm</sub>)

Die Daten sollten folgende Kriterien erfüllen:

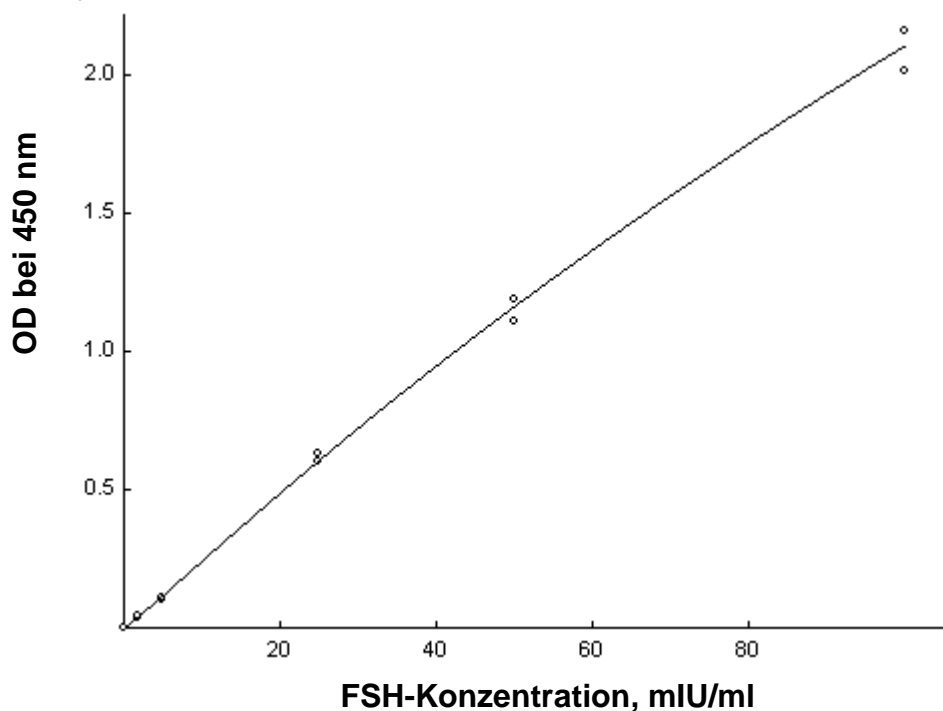
- Mittelwert der OD des Blank (der Kavität A1-A2)  $\leq 0,100$
- Mittelwert der OD des Kalibrator 5  $\geq 1,5$  (nach Blank Subtraktion)
- Konzentration der Kontrolle muss innerhalb des Bereiches liegen, welcher auf dem Quality Control Sheet angegebenen ist

Sollten die gemessenen Daten die Bedingungen nicht erfüllen, werden die Resultate als unzulässig betrachtet und der Test sollte wiederholt werden.

### 13.4.2 Quantitative Bestimmung

Eine spezialisierte Software zur quantitativen Bestimmung wird empfohlen. Die Mittelwerte der OD der Kalibratoren werden gegen deren jeweilige FSH-Konzentration mittels **4PL oder 5PL Näherung** (Abb.2 Typische Standardkurve) aufgetragen. Die FSH-Konzentration der Probe wird mit der Standardkurve ermittelt.

Eine Extrapolation der Standardkurve für FSH-Konzentrationswerte, die die Konzentration in Kalibrator 5 überschreiten (etwa 100 mIU/ml), ist nicht zulässig.



*Abb. 2 Typische Standardkurve*

***Beispielstandardkurve! Nicht zur Auswertung benutzen***

### 13.5 Assay-Schema zum Assay-Protokoll 1

Kavitäten Reagenzien	«Blank»	<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	Proben
	<b>CONJ</b>	–	100 µl
<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	–	50 µl	–
Proben	–	–	50 µl
Inkubation No.1	60 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
<b>WASH P</b> (verdünnt)	5 x 300 µl		
<b>SUB</b>	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubation No.2	15–30 Min, +18...+25 °C, im Dunkeln		
	10 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
<b>STOP</b>	100 µl	100 µl	100 µl
Rühren	1–2 Min, +18...+25 °C		
OD-Messung	450 nm		
Berechnung	Spezielle Software		

## 14. AUTOMATISIERTER TEST (REF 21-06 A)

### 14.1 Packungsinhalt

<b>MP</b>	<b>Mikrotiterplatte:</b> Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (96 Kavitäten) beschichtet mit monoklonalen Anti-FSH-Antikörpern.	1 Platte
<b>CONJ</b>	<b>Konjugat:</b> Lösung aus Anti-FSH - Antikörpern konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP).	14 ml, gebrauchsfertig
<b>0-5 CAL</b>	<b>FSH Kalibratoren:</b> Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter FSH-Konzentration – 0; 2; 5; 25; 50; 100 mIU/ml. (ungefähre Werte- bitte nicht für die Auswertung von realen Testdaten verwenden). Für Lot spezifische FSH-Konzentrationen siehe Werte im Quality Control Shee.	8 Fläschchen <b>CAL</b> 1, 4- 2 × 0,5 ml; <b>CAL</b> 0, 2, 3, 5 - 1 × 0,5 ml; gebrauchsfertig oder lyophilisiert
<b>CONTROL</b>	<b>FSH Kontrolle:</b> Protein-Puffer oder Lyophilisat mit definierter FSH - Konzentration. Der FSH - Konzentrationsbereich ist auf dem im Quality Control Sheet angegeben.	2 x 0,5 ml gebrauchsfertig oder lyophilisiert
<b>WASH P 20X</b>	<b>Waschlösung P, 20x konzentriert:</b> Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 1000ml Lösung.	50 ml, konzentriert
<b>SUB</b>	<b>Substrat (TMB-Lösung):</b> 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer mit Wasserstoffperoxid.	14 ml, gebrauchsfertig
<b>STOP</b>	<b>Stopplösung:</b> 1 N HCl-Lösung	19 ml, gebrauchsfertig
<b>TRIAL 5000X</b>	<b>Trial-Lösung, 5000x konzentriert:</b> Reinigungslösung	Ist separat zu beziehen



**Anmerkung:** Extra Fläschchen der **CAL** 1 und 4 sowie **CONTROL** werden zur Rekalibrierung der Referenz-Standardkurve bereitgestellt. Genauere Informationen sind in der Gebrauchsanleitung des ELISA-Automaten "Alisei" zu finden.

## 14.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- ELISA-Automat "Alisei";
- Polypropylen Röhrchen 12x 75, Volumen: 5,5 ml;
- **TRIAL** **5000X** Trial-Lösung, 5000x konzentriert\* ;
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser,
- Laborhandschuhe.

## 14.3 Testverfahren

Der **Gonadotropin FSH Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine Einzelbestimmung von 88 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und für die Bestimmung des Blank (=OD der TMB-Lösung).

### 14.3.1 Reagenzien Vorbereitung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) gebracht und gründlich gemischt werden.

**Anmerkung:** Vorbereitung der anderen Reagenzien siehe Abschnitt 8.

**TRIAL** Trial-Lösung zum Reinigen der gerät-internen Hydraulikleitungen und Nadeln des ELISA-Automaten.

\* Reagenz ist nicht Teil des Kits und kann separat bezogen werden.

Zubereitung der benötigten Menge der Trial-Lösung vor der Analyse durch 5000fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem oder deionisiertem Wasser:

2 ml **TRIAL 5000X** + 9998 ml Wasser.

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

### **14.3.2 Testablauf des automatisierten Tests**

Bei Benutzung des ELISA-Automaten „Alisei“ ist die entsprechende Gebrauchsanweisung des Gerätes zu verwenden.

Die Durchführung des Enzymassays mit „Alisei“ ist komplett automatisch: Pipettieren der Reagenzien, Waschschritte, Inkubation, OD-Messung und Analyse der Testergebnisse. Das Programm zur Berechnung der FSH -Konzentration ist im Gerät ebenfalls enthalten.

## **14.4 Datenverarbeitung**

### **14.4.1 Datenverlässlichkeit (OD<sub>450 nm</sub>)**

Siehe Kriterien des Abschnittes **13.4.1**.

## **14.5 Vorsichtsmaßnahmen**

- Bei mehrfacher Nutzung des Testkit in einem ELISA-Automaten müssen die Reagenzien aufgrund der Verdunstung unmittelbar nach Beenden des Pipettiervorganges aus dem Automaten genommen werden, um einen möglichen Verlust durch Verdunstung zu vermeiden. Die Reagenzien sind in den Kühlschrank zu stellen.

- Die Rekalibrierung anhand der Standardkurve eines Testkits mit anderer Lotnummer ist nicht zulässig.

## 2. INTENDED USE

**Gonadotropin FSH kit** is provided for the **quantitative determination of follicle-stimulating hormone (FSH) in human serum.**

This test has 2 complete sets:

**REF 21-06** for manual use,

**REF 21-06 A** must be used with ELISA automatic instrument “Alisei” manufactured by NEXT Level S.r.l. hereinafter referred to as analyser “Alisei”.

Instructions for use:

Section 13 for manual test,

Section 14 for *analyser*.

**Note 1:** *Take into account that calibrators' nominals can be different for manual and automatic test kits.*

**Note 2:** *We guarantee applications of test:*

**REF 21-06 A** only on analyser “Alisei”,

**REF 21-06** only for manual use.

*While using non predefined methods of use, it is under end user responsibility, to make sure that it was appropriately tested for ELISA kits.*

FSH is a glycoprotein with a molecular mass of about 30 000 Da, that consists of two subunits – alpha and beta. FSH is secreted by frontal lobe of pituitary gland.

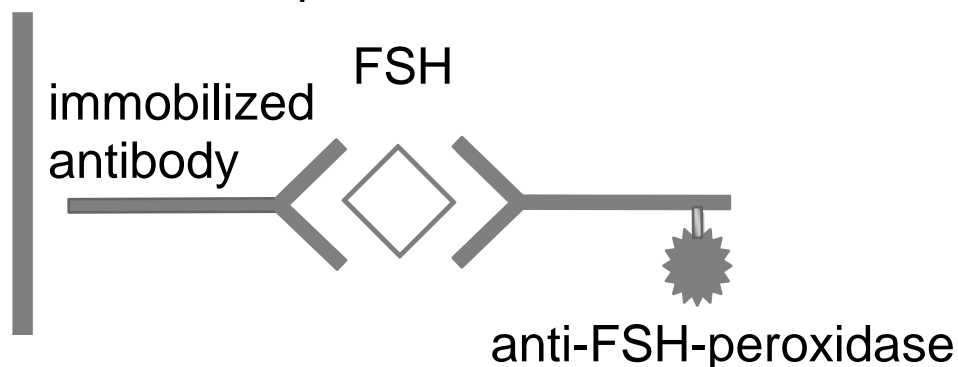
Together with LH and testosterone, FSH is necessary for spermatogenesis in spermatic ducts of testicles. In pubescent females FSH induces follicle growth and maturation in ovaries.

Increased FSH levels are observed in patients with different forms of hypogonadism (primary ovary or testicle insufficiency, polycystic ovaries, menopause etc), renal insufficiency, cirrhosis and also as a result of castration. As a rule, decreased FSH levels are observed in the case of testicle malignancies.

FSH measurement is useful for the diagnosis of menopause, exact determination of ovulation time and for endocrine therapy monitoring.

### 3. PRINCIPLE OF TEST

**Gonadotropin FSH kit** is a “sandwich” type of solid-phase enzyme immunoassay, based on two monoclonal antibodies that are specific for different epitopes of FSH  $\beta$ -subunit. One of these antibodies is conjugated with horseradish peroxidase (HRP); the other is coated onto the inner surface of microwells. FSH molecules from the serum sample bind to both immobilized antibody and anti-FSH-peroxidase conjugate (Fig.1). Then the wells are washed with wash solution to remove any material not bound on the inner surface of the wells. Quantity of the bound conjugate is directly proportional to FSH level in the sample.



### *Fig. 1 Assay scheme*

During the incubation with TMB solution the colour is developing.

The intensity of the colour is directly proportional to FSH concentration in specimens. FSH concentration in the patient sample is read from a standard curve that is processed in each assay.

#### **4. STORAGE AND STABILITY OF THE KIT**

The expiration date of the kit is printed on the box label; the expiration date for each component is printed on the respective label.

**Gonadotropin FSH kit** should be stored at +2...+8 °C upon receipt, preferably in the original kit box, until the expiration date. Storage at +25 °C is allowed but for no more than 5 days.

Shelf life of the kit is 18 months.

After initial opening, the kit is stable for 12 months if stored at +2...+8 °C.

If used in several separate experiments, after initial opening kit contents should be stored as follows but never used longer than the expiration date:

- unused strips: in a firmly closed resealable zipper bag at +2...+8 °C until the expiration date;
- vials with conjugate, calibrators and control (ready-to-use): at +2...+8 °C for 12 months; vials with calibrators and control (reconstituted): at +2...+8 °C for no more than 6 months after opening;

- vials with concentrated Trial, concentrated wash solution and stop solution: at +2...+8 °C until the expiration date;
- vial with substrate: at +2...+8 °C until the expiration date, protected from light;
- wash solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days or at +2...+8°C for no more than 4 weeks in a firmly closed bottle;
- Trial solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days in a firmly closed bottle.

### **Damaged Test Kits**

In case of any severe damage of the test kit or components, Astra Biotech GmbH has to be informed in writing, during one week after receiving the kit. Usage of severely damaged single components for a test run is not recommended.

## **5. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE**

Collect blood by venipuncture. After clotting, the serum is separated by centrifugation.

Do not use plasma, haemolyzed (bright red) or lipaemic (milky) serum samples as well as samples containing sodium azide as preservative.

Store serum samples at +2...+8 °C for no more than 5 days. Aliquot and freeze the samples for a longer storage ( $\leq -20$  °C). Avoid repeated freezing.

## 6. EXPECTED VALUES

Serum samples collected between 9 and 11 a.m. from apparently healthy people at the age of 19–65, were assayed with Gonadotropin FSH kit. The results are given in the table on the next page. These limits should be considered as guidelines only.

Category	No	Mean (mIU/mL)	Range (mIU/mL)
<i>Females</i>			
Normally menstruating (19–35 years old)	120		
Follicular phase		4.6	1.8-11.3
Midcycle peak		7.9	4.9-20.4
Luteal phase		3.3	1.1-9.5
Postmenopausal (49–65 years old)	15	68.4	31.0-130
<i>Males (21–39 years old)</i>	40	3.9	1.0-11.8

It is highly recommended for each laboratory to determine its own reference range of FSH concentrations.

## 7. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to the state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

## 8. REAGENT PREPARATION

Allow all the reagents to reach room temperature (+18...+25 °C), and then thoroughly stir.



**MP microplate**

Keep the **microplate** at room temperature for at least 30 minutes before opening the bag. Place required number of strips onto strip holder. Place unused strips into the resealable zipper bag and reseal duly.

**CAL CONTROL Calibrators and Control**

Liquid calibrators and control are ready to use.

Prepare lyophilized calibrators and control as follows. Gently tap on the vial caps to knock off all the dry matter. Open the vials and carefully place the caps upside down on the clean dry surface. Add 0.5 mL of distilled or deionized water to each vial with lyophilized calibrators and control, close vials with the corresponding caps and leave for 10 min at room temperature without stirring. Then stir gently avoiding foaming, until the dry matter is completely dissolved.

Leave for another 10 minutes at room temperature stirring gently periodically. Make sure that no dry matter is left on the caps and walls of the vials.

**WASH P** Prepare required volume of **wash solution** by dilution of the concentrate 20-fold with distilled or deionized water. For example:

5 mL **WASH P 20X** + 95 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

**SUB** Protect **substrate** from direct light.

## 9. SAMPLE PREPARATION

Allow samples to reach room temperature. Stir samples gently in order to ensure homogeneity.

## 10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY

### 10.1. Calibration – Traceability:

Gonadotropin FSH kit was calibrated against the WHO 2nd International Reference Preparation 78/549.

### 10.2. Specificity:

According to Product specification provided by the supplier, cross-reactivity of both monoclonal antibodies with hCG is less than 0.1%, with TSH is less than 3.5% and with LH does not exceed 1.5%.

### 10.3. Analytical Sensitivity:

Analytical sensitivity of **Gonadotropin FSH kit**, i.e. concentration that can be distinguished from zero calibrator, is 0.25 mIU/mL. It is defined as mean OD of 10 replicates of calibrator 0 plus two standard deviations.

### 10.4. Measurement Range:

**Gonadotropin FSH kits** (manual and Alisei kits) were validated for measurement of FSH concentration within the concentration diapason (without dilution) 0.25-100 mIU/mL.

### 10.5. Hook Effect:

Hook effect is determined by spiking calibrators matrix with antigen. No high-dose hook effect was observed for FSH concentrations up to 50 000 mIU/mL.

### 10.6. Intra- and Inter-Assay Variation:

For intra-assay CV determination 8 serum samples were assayed in 9 replicates each. The results are shown below.

#### Manual Kit

Sample	Mean FSH concentration, mIU/mL	Intra-assay CV	
		SD	CV, %
1	3.0	0.23	7.7
2	2.7	0.1	3.7
3	5.5	0.1	1.8
4	5.8	0.1	1.7
5	9.7	0.2	2.1
6	56.6	1.0	1.8
7	84.1	1.4	1.7
8	3.0	0.23	7.7

#### Alisei kit

Sample	Mean FSH concentration, mIU/mL	Intra-assay CV	
		SD	CV, %
1	2.0	0.14	7.2
2	4.5	0.19	4.1
3	8.8	0.29	3.3
4	15.4	1.13	7.3
5	21.9	1.27	5.8
6	44.4	2.30	5.2
7	60.3	1.58	2.6
8	84.7	3.67	4.3

For **inter-assay CV determination** 8 serum samples were assayed 3 times by different operators with 1-week interval. Each specimen was assayed in 9 replicates. The results are shown below.

## Manual kit

Sample	Mean FSH concentration, mIU/mL			Inter-assay CV	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	5.2	5.8	4.9	0.46	8.6
2	6.2	5.9	6.0	0.15	2.5
3	8.0	7.3	8.2	0.47	6.0
4	10.6	11.2	10.8	0.31	2.8
5	15.5	15.9	14.9	0.50	3.3
6	25.3	24.9	25.5	0.31	1.2
7	59.5	57.9	59.9	1.06	1.8
8	90.3	95.6	88.9	3.53	3.9

## Alisei kit



Sample	Mean FSH concentration, mIU/mL			Inter-assay CV	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	2.0	2.3	2.1	0.15	7.2
2	4.5	4.1	3.9	0.30	7.3
3	8.8	8.9	9.2	0.21	2.3
4	15.4	13.9	14.6	0.75	5.1
5	21.9	20.1	21.6	0.96	4.5
6	44.4	47.2	42.6	2.32	5.2
7	60.3	56.8	59.4	1.82	3.1
8	84.7	85.3	88.1	1.81	2.1

## 11. LIMITATION OF THE METHOD



Any clinical diagnosis should not be based on the results of in vitro diagnostic methods alone. To state a diagnosis, the physician is supposed to consider all the available clinical and laboratory findings.

## 12. SAFETY PRECAUTIONS

- **This kit is for in vitro diagnostic use only.** Operator should follow the manual closely in order to ensure reliable data. The manual is valid for the present kit only, within the listed composition. Any substitution of kit components is not allowed by CE regulations.
- Do not use kit or its components after the expiration date indicated on the label. Take into account stability period for reconstituted reagents.
- Do not mix or use together reagents from different lots of the kit except substrate, stop solution and wash solution.
- Do not use substrate, stop solution and wash solution supplied by other vendors.
- Use only “P”-labeled Astra Biotech wash solution.
- Note that stop solution is 1 N HCl solution. Avoid contacts with skin and mucosa. In case of contact rinse affected area thoroughly with plenty of water and seek medical advice.
- Take into account the following common procedural notes:
  - always pipette reagents into wells immediately after washing procedure;
  - avoid contamination of the solutions;

- in case of partial use of the kit, dispense only required volume of the reagent into the tray;
  - do not pour unused reagents back into the original vials;
  - avoid exposure to direct sunlight during incubations;
  - always pipette reagents in the same order to minimize reaction time differences between wells; the total dispensing time for the calibrators, control and samples must not exceed 15 min;
  - the incubation temperature for all the immunological reactions must be kept at +37 °C;
  - do not touch the bottom of the wells;
  - calibrators should be measured in each separate assay. It is also recommended to measure each time FSH concentration in the control.
  - remove the adhesive foil carefully to avoid contamination and don't use the adhesive foil repeatedly.
- TMB solution should be colourless. Light colouring of solution is admissible. Avoid direct exposure of substrate to sunlight.
  -  Source materials of human origin used for kit components preparation were tested and found negative for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV antibodies. However, none of known laboratory test guarantees absence of these viral agents. Therefore, all kit components and patient's samples should be handled as potentially hazardous.
  -  After usage strips, calibrators, control, specimens and all consumables which contacted with specimens during handling, storage or assay (tubes, vials, gloves, pipette tips

etc.) should be collected separately and sterilized by autoclaving. Instead of autoclaving pipette tips may be sterilized by disinfectant treatment. After sterilization all components and expendable materials may be utilized as non-dangerous garbage. Other components of the kit should be discarded into conventional garbage.

-  During manual washing procedure do not discard the contents of the wells directly to drainage. Use a container with disinfectant solution.
-  As the kit contains potentially hazardous material, the following precautions should be taken:
  - do not smoke, eat or drink while performing the assay;
  - always use protective gloves;
  - never pipette material by mouth;
  - in case of spilling, wipe up the spills promptly and wash affected area thoroughly using decontaminant.
- GLP including all general and individual regulations should be applied for the kit usage.



As the kit contains irritant (**CONJ**, **CAL**, **CONTROL**), the following precautions should be observed:

- P261 - Avoid breathing spray;
- P272 - Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace;
- P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection;
- P302+P352 - IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water;

- P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention;
- P363 - Wash contaminated clothing before reuse;
- P501 - Dispose of contents/container in accordance with national regulation.

Precautionary statements according to Regulation EC № 1272/2008.



## 13. MANUAL TEST (REF 21-06)

### 13.1. Material Provided

<b>MP</b>	<b>Microplate:</b> 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-FSH monoclonal antibodies	1 pcs
<b>CONJ</b>	<b>Conjugate:</b> solution contains anti-FSH monoclonal antibodies conjugated with HRP	14 mL, ready to use
0-5 <b>CAL</b>	<b>FSH calibrators:</b> protein-based solution or lyophilized preparations containing known FSH concentrations – 0; 2; 5; 25; 50; 100 mIU/mL (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). The concentrations of calibrators may be different for Assay Protocol 1 and 2. For lot specific FSH concentrations see values for respective Assay Protocol provided in the Quality Control Sheet.	6 vials, 0.5 mL each; ready to use or lyophilized
<b>CONTROL</b>	<b>FSH control:</b> protein-based solution or lyophilized preparation containing known FSH concentration. The range of FSH concentration may be different for Assay Protocol 1 and 2. For lot specific ranges of FSH concentration see values for respective Assay Protocol provided in the Quality Control Sheet.	0.5 mL, ready to use or lyophilized
<b>SUB</b>	<b>Substrate (TMB solution):</b> 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use

<b>WASH P</b>  <b>20X</b>	<b>Wash solution P, 20X concentrated:</b> surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 560 mL of solution	2x14 mL, concentrated
<b>STOP</b>	<b>Stop solution</b> 1 N HCl solution	14 mL, ready to use
	<b>Adhesive foil</b>	2x1 foil (optional)

## 13.2. Equipment and Materials Required but not provided

- 1-channel calibrated variable precision pipettes, with disposable tips;
- 8-channel calibrated variable precision pipette, with disposable tips;
- microplate incubator (+37 °C) or microplate incubator-shaker (+37 °C, 500–800 rpm);
- manual or automatic equipment for rinsing wells;
- calibrated microplate reader (450 nm);
- vortex tube mixer;
- deionized or distilled water;
- graduated beaker and cylinder of appropriate volume;
- latex or plastic gloves;
- trays for pipetting reagents with 8-channel pipette;
- disinfectant;
- absorbent material (for manual wash).

## 13.3. Test Procedure

**Gonadotropin FHS kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for the **quantitative assay** of 40 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in duplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

### 13.3.1 Assay Procedure

**Note:** *Please check in the Quality Control Sheet supplied with the kit for which Assay Protocol your kit has been validated. If your kit has been validated for Assay Protocol 1, please follow the Assay Protocol 1 described below. If your kit has been additionally validated for Assay Protocol 2, please consider the Supplement 1 to the Instructions for use provided with the kit.*

#### Assay Protocol 1

(see also Assay scheme to Assay Protocol 1, section 13.5)

**Note:** *Consider concentrations of calibrators and control range for Assay Protocol 1 provided in the Quality Control Sheet.*

**All samples should be tested in duplicates.**

- A.** Pipette **100 µL conjugate** **CONJ** into each well **except wells A1-A2 (blank)**;
- B.** Pipette **50 µL calibrators** **CAL**, control **CONTROL** and prepared **patient's samples in duplicates**. Leave wells A1-A2 empty for blank!

**Note:** *total time of dispensing must not exceed 15 minutes, otherwise the test result may be unreliable, because the time of incubation will substantially vary for different samples.*

**Note:** *If an adhesive foil is used, put it now onto the plate to seal the cavities.*

- C.** Incubate for **60 minutes at +37 °C while shaking (500–800 rpm)**.

**Note:** *If an adhesive foil is used, remove it now from the plate.*

- D.** Wash **5 times**, as described below.
- E.** Pipette **100  $\mu$ L substrate** **SUB** into each well (including blank); incubate strips **at room temperature** (+18...+25 °C) **in the dark for 15-30 minutes**, depending on the colour intensity, or **10 minutes while shaking (500-800 rpm) at +37 °C**.
- F.** Pipette **100  $\mu$ L stop solution** **STOP** into each well (including blank) in the same sequence and at the same speed as used for dispensing TMB substrate. **Shake for 1–2 min at room temperature**.
- G.** Read OD at **450 nm within 20 min**.

### 13.3.2. Wash Procedure

It is advisable to use an automatic microplate washer set at 5 wash cycles and a volume of 300  $\mu$ L of wash solution per well per cycle.

If an automatic washer is not available, the wash procedure can be carried out manually as follows:

- remove the contents of the wells into a container with disinfectant;
- dispense 300  $\mu$ L of wash solution (section 8) into each well, shake the plate carefully for 5 – 10 sec and remove the contents of the wells; repeat 5 times;
- strike the wells sharply on absorbent material to remove any liquid residue.

## 13.4. Data Processing

If the reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in wells A1-A2, subtract mean OD value of wells A1-A2 from all OD values before further calculations.

*Example:*

OD (Cal 5) measured = 2.28 and OD (blank) = 0.06;

OD (Cal 5) calculated =  $2.28 - 0.06 = \underline{2.22}$

### 13.4.1. Data Reliability (for OD<sub>450 nm</sub>)

The data should meet the following criteria:

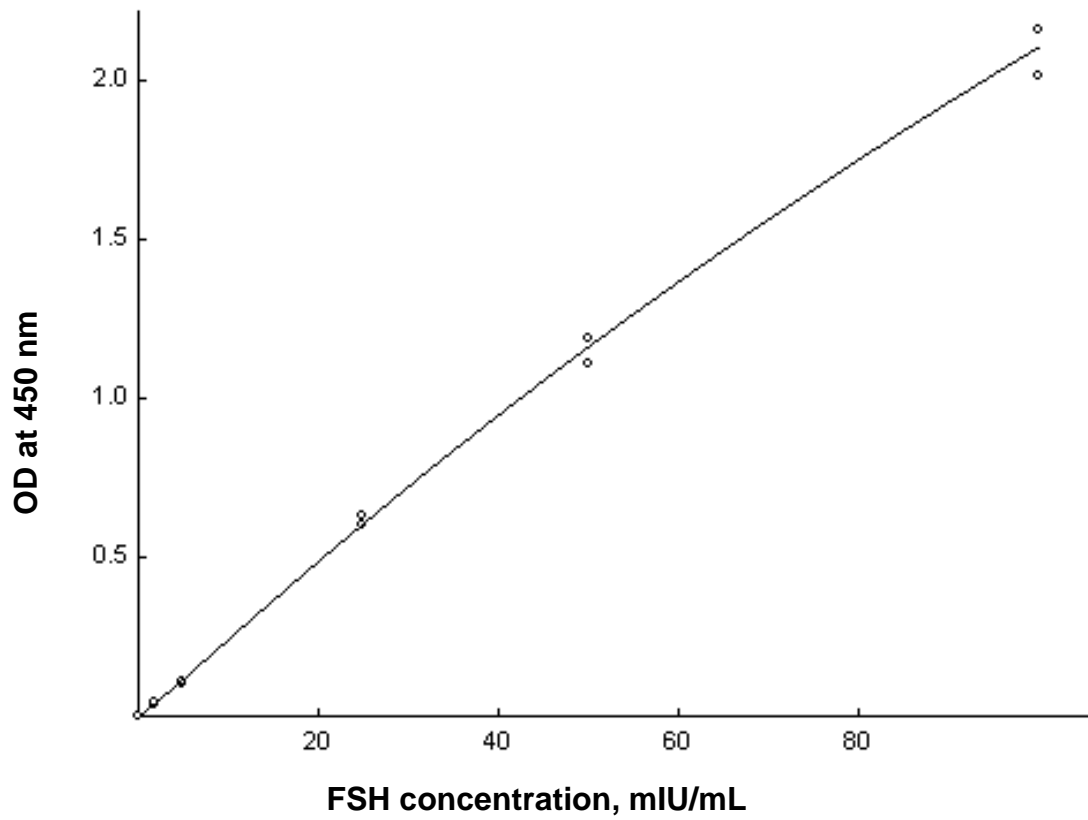
- average blank OD (in wells A1-A2)  $\leq 0.100$ ;
- average OD of Cal 5  $\geq 1.5$  (after blank subtraction).
- control's concentration must fall within the acceptability ranges that is shown on the Quality Control Sheet.

If the data obtained do not meet the criteria, the results are considered unreliable and the test should be repeated.

### 13.4.2. Quantitative Determination

Specialized software for quantitative determination is recommended. Mean OD values of the calibrators at 450 nm versus their respective FSH concentrations using **4PL** or **5PL fit** (Fig. 2 Typical standard curve). Calculate concentration of FSH in samples using standard curve.

Any extrapolation of the standard curve to FSH above the nominal value of the calibrator 5 (approximately 100 mIU/mL) is forbidden.



*Fig. 2. Example of typical standard curve.*  
**Do not use for evaluation of real assay data!**

### 13.5 Assay scheme to Assay Protocol 1

Wells	«Blank»	<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	Samples
Reagents			
<b>CONJ</b>	–	100 µL	100 µL
<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	–	50 µL	–
Samples	–	–	50 µL
Incubation No.1	60 min, +37 °C, 500–800 rpm		
<b>WASH P</b> (diluted)	5 x 300 µL		
<b>SUB</b>	100 µL	100 µL	100 µL
Incubation No.2	15–30 min, +18...+25 °C, in the dark		
	10 min, +37 °C, 500–800 rpm		
<b>STOP</b>	100 µL	100 µL	100 µL
Stirring	1–2 min, +18...+25 °C		
OD measuring	450 nm		
Calculations	Corresponding software		



## 14. AUTOMATIC TEST (REF 21-06 A)

### 14.1. Material Provided

<b>MP</b>	<b>Microplate:</b> 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-FSH monoclonal antibodies	1
<b>CONJ</b>	<b>Conjugate:</b> solution contains anti-FSH monoclonal antibodies conjugated with HRP	14 mL, ready to use
<b>0-5 CAL</b>	<b>FSH calibrators:</b> protein-based solution or lyophilized preparations containing known FSH concentrations – 0; 2; 5; 25; 50; 100 mIU/mL. (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). For lot specific FSH concentrations see values provided in the Quality Control Sheet..	<b>8 vials,</b> <b>CAL</b> 1, 4- 2× 0.5mL; <b>CAL</b> 0,2,3,5- 1× 0.5mL; ready to use or lyophilized
<b>CONTROL</b>	<b>FSH control:</b> protein-based solution or lyophilized preparation containing known FSH concentration. For lot specific ranges of FSH concentrations see Quality Control Sheet.	2 × 0.5 mL; ready to use or lyophilized
<b>WASH P 20X</b>	<b>Wash solution P, 20X concentrated:</b> surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 1000 mL of solution	50 mL, concentrated
<b>SUB</b>	<b>Substrate (TMB solution):</b> 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
<b>STOP</b>	<b>Stop solution</b> 1 N HCl solution	19 mL, ready to use
<b>TRIAL 5000X</b>	<b>Trial solution, 5000X concentrated:</b> solution of detergent	It is delivered by separate order

**Note:** Extra vials of **CAL** 1, 4 and **CONTROL** are provided for recalibration on reference calibration curve. For detailed information see instruction for use analyser “Alisei”.

## 14.2. Equipment and Materials Required but not provided

- Automatic analyser for ELISA kits on microplate (analyser “Alisei”);
- multipurpose polypropylene tubes 12x75 volume 5.5 mL;
- **TRIAL 5000X** Trial solution, 5000X concentrated,
- deionized or distilled water;
- latex or plastic gloves.

## 14.3. Test Procedure

**Gonadotropin FSH kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for 88 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in monoplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

### 14.3.1. Reagent Preparation

Allow all the reagents to reach room temperature (+18...+25 °C), and then thoroughly stir.

**Note:** Preparation of other reagents see in section 8.

**TRIAL** Working solution of Trial for washing internal hydraulic lines and needles of automatic analyser “Alisei”. Prepare required volume of Trial solution by dilution of the concentrate 5000-fold with distilled or deionized water before analysis:

2 mL **TRIAL 5000X** + 9998 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

### **14.3.2. Assay Procedure for Automatic Test**

While using for the procedure analyser “Alisei”, refer to its relative manual.

The analysis on analyser “Alisei” is completely automatic: pipetting of reagents, washing, incubation, OD measurement, analysis of results. The program of calculation FSH concentration is hardwired in analyser memory.

### **14.4. Data Processing**

#### **14.4.1. Data Reliability (for OD<sub>450 nm</sub>)**

See criteria in section **13.4.1.**

### **14.5. Safety precautions**

- If kit for analyser “Alisei” is used in several separate experiments it is necessary to take reagents from analyser “Alisei” immediately after pipetting them in the wells of all plates because liquid evaporates from vials. Put the reagents in refrigerator;
- Recalibration using calibration curve, obtained with a kit of any other lot, is not permitted.

August, 23, 2019



Astra Biotech GmbH  
Rudower Chaussee 29,  
12489 Berlin, Germany  
Telefon: +49 (0)30 74696509  
E-Mail: [info@astrabiotech.de](mailto:info@astrabiotech.de)  
[www.astrabiotech.de](http://www.astrabiotech.de)