



FSH-IRMA

KIP0841

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

History

Summary of change:

Current Version:
230123
New logo



en

Read entire protocol before use.

FSH-IRMA

I. INTENDED USE

Immunoradiometric assay kit for the *in vitro* quantitative measurement of human Follicle Stimulating Hormone (FSH) in serum and plasma.

II. GENERAL INFORMATION

A. Proprietary name : DIAsource FSH-IRMA Kit

B. Catalog number : KIP0841: 96 tests

C. Manufactured by : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

The measurement of LH and FSH concentrations in serum is essential for investigating fertility and especially disorders of the hypothalamic/pituitary/gonadal axis.

Both LH and FSH are secreted by the basophil cells of the anterior pituitary as a result of gonadotropin releasing hormone (GnRH) secretion from hypothalamic cells.

In adults, LH and FSH hormones control gonadal functions; mainly gametogenesis and steroid secretion.

Circulating levels of FSH are controlled by a negative feedback effect on the hypothalamus by steroid hormones and gonadal peptides.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DiaSource FSH-IRMA is an immunoradiometric assay based on coated tubes separation. Mabs1, the capture antibodies, are attached to the lower and inner surface of the plastic tube. Calibrators or samples added to the tubes will at first show low affinity for Mabs1. Addition of Mab2, the signal antibody labelled with ^{125}I , will complete the system and trigger the immunological reaction. After washing, the remaining radioactivity bound to the tube reflects the antigen concentration. The use of several distinct Mabs avoids hyperspecificity.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	Quantity 96 tests	Quantity 4x96 tests	Colour Code	Reconstitution
Tubes coated with anti FSH (monoclonal antibodies)	2 x 48	8 x 48	red	Ready for use
Anti-FSH- ^{125}I (monoclonal antibodies) in borate-PO ₄ buffer with bovine serum albumin, azide (<0.1%) and inert red dye	1 vial 5.5 ml 700 kBq	4 vials 5.5 ml 4x700 kBq	red	Ready for use
Zero Calibrator in bovine serum with thymol	1 vial lyophil.	2 vials lyophil.	yellow	Add 2 ml distilled water
Calibrators 1-6 in bovine serum with thymol (see exact values on vial labels)	6 vials lyophil.	12 vials lyophil.	yellow	Add 1 ml distilled water
Wash solution (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	4 vials 10 ml	brown	Dilute 70x with distilled water (use a magnetic stirrer).
Controls 1 and 2 in human plasma with thymol	2 vials lyophil.	4 vials lyophil.	silver	Add 0.5 ml distilled water

Note: 1. Use the zero calibrator for sera dilutions.
 2. 1 mIU of the calibrator is equivalent to 1 mIU of the 1st IS 92/510.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 50 µl, 100 µl, 500 µl, 1 ml and 2 ml. (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Tube shaker
6. 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
7. Aspiration system (optional).
8. Any gamma counter capable of measuring ^{125}I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- A. **Calibrators** : Reconstitute the zero calibrator with 2 ml distilled water and the other calibrators with 1 ml distilled water..
- B. **Controls** : Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- C. **Working Wash solution** : Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kit components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution, calibrators and controls are stable for 3 days at 2-8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 3 months. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum and plasma must be kept at 2 – 8°C.
 - If the test is not run within 24 hours, storage in aliquots at -20°C is recommended.
 - Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
 - Serum, heparinized or EDTA plasma provide similar results.
- $Y \text{ (serum)} = 1.00x \text{ (hep. plasma)} + 0.3 \quad r = 0.99 \quad n = 39$
 $Y \text{ (serum)} = 1.02x \text{ (EDTA plasma)} + 0.3 \quad r = 0.99 \quad n = 39$

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date. Do not mix materials from different kit lots. Bring all the reagents to room temperature prior to use. Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision. Respect the incubation times. Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

B. Procedure

1. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample. For determination of total counts, label 2 normal tubes.
2. Briefly vortex calibrators, samples and controls and dispense 100 µl of each into the respective tubes.
3. Dispense 50 µl of anti-FSH- ^{125}I tracer into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
4. Shake the rack containing the tubes gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
5. Incubate for 1 hour at room temperature on a tube shaker (700 rpm).
6. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
7. Wash the tubes with 2 ml Wash Solution (except total counts). Avoid foaming during the addition of the Working Wash Solution.
8. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts).
9. Wash again the tubes with 2 ml Wash Solution (except total counts) and aspirate (or decant).
10. After the last washing, let the tubes standing upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
11. Count the tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean of duplicate determinations.
2. On semi-logarithmic or linear graph paper plot the c.p.m. (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of FSH (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points, reject the obvious outliers.
3. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
4. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

FSH-IRMA		cpm	B/T (%)
Total count		362200	100
Calibrator	0.0 mIU/ml	119	0.03
	0.7 mIU/ml	1265	0.35
	3.5 mIU/ml	2783	0.77
	10.4 mIU/ml	8400	2.32
	30.0 mIU/ml	28008	7.73
	100.0 mIU/ml	102364	28.26
	152.0 mIU/ml	160536	44.32

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection Limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations above the average counts at zero binding, was 0.1 mIU/ml.

B. Specificity

Cross-reactive hormones were added to a low and to a high FSH value calibrator. The apparent FSH response was measured.

added Hormone	FSH CAL 1		FSH CAL 5	
	mIU/ml	mIU/ml	mIU/ml	mIU/ml
-	0.65	100		
LH 300 mIU/ml	1.31	99.16		
hCG 300000 mIU/ml	1.46	100.31		
TSH 300 µIU/ml	0.98	98.31		

C. Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	$\bar{X} \pm S.D.$ mIU/ml	CV (%)	Serum	N	$\bar{X} \pm S.D.$ (mIU/ml)	CV (%)
A	10	4.0 ± 0.1	1.8	A	20	15.0 ± 3.0	4.4
B	10	9.0 ± 0.2	2.0	B	20	41.9 ± 1.0	2.4
C	10	50.7 ± 0.5	1.1				

D. Accuracy

RECOVERY TEST			
Sample	Added FSH (mIU/ml)	Recovered FSH (mIU/ml)	Recovery (%)
Serum	6.4	6.2	97
	25.1	23.6	94
	88.8	86.1	97
Heparin plasma	6.4	7	109
	25.1	25.1	100
	88.8	96	108
EDTA plasma	6.4	7.3	114
	25.1	23.6	94
	88.8	84.1	95

DILUTION TEST			
Sample	Dilution	Theoretical Concent. (mIU/ml)	Measured Concent. (mIU/ml)
Serum 1	1/1	-	8.6
	1/2	4.3	4.1
	1/4	2.2	2
	1/8	1.1	1.1
	1/16	0.5	0.5
Serum 2	1/1	-	59.6
	1/2	29.8	31.3
	1/4	14.9	16.5
	1/8	7.5	8.2
	1/16	3.7	4.0
	1/32	1.9	2.0
	1/64	0.9	1.0

Samples were diluted with zero calibrator.

E. Time Delay

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 45 minutes after the calibrator has been added to coated tubes.

TIME DELAY

	0'	15'	30'	45'
Serum 1 (mIU/ml)	1.9	1.7	1.8	1.7
Serum 2 (mIU/ml)	4.2	4.3	4.2	4.2
Serum 3 (mIU/ml)	9.6	9.5	9.3	9.3
Serum 4 (mIU/ml)	52.0	52.0	52.0	53.0

F. Hook effect

A sample spiked with FSH up to 1000 mIU/ml gives higher counts than the last calibrator point.

XIV. LIMITATIONS

- Specimens from patients who have received preparations of mouse monoclonal antibodies for diagnosis or therapy may contain human anti-mouse antibodies (HAMA). Such specimens may show either falsely elevated or depressed values when tested with assay kits which employ mouse monoclonal antibodies.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with *in vitro* immunoassays. Patients routinely exposed to animals or animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed in case of the presence of heterophilic antibodies. Carefully evaluate the results of patients suspected of having these antibodies. If results are not consistent with other clinical observations, additional information should be required before diagnosis.

XV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises

XVI. REFERENCE INTERVALS

The values provided below are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

The range is expressed as 2.5% to 97.5% percentiles.

Identification	Number of subjects	Mean (mIU/ml)	Range (mIU/ml)
Children (0 to 12 years)			
▪ Boys	20	0.9	0.1 – 2.3
▪ Girls	20	2.7	0.4 – 12.7
Pubers (12 to 18 years)	18	4.5	0.3 – 9.0
Adult males	69	4.2	1.3 – 8.1
Women			
▪ Ovulatory cycles			
- Follicular phase (day -12 to -6)	34	6.1	1.8 – 9.4
- Ovulatory peak (day 0)	48	11.9	3.4 – 33.1
- Luteal phase (day +6 to +12)	63	4.3	1.2 – 13.4
▪ Postmenopausal	53	64.7	27.7 – 93.3

XVII. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For in vitro diagnostic use only.

This kit contains ^{125}I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.

This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

XVIII. BIBLIOGRAPHY

- CLARKE J.J., CUMMINS J.T. (1987)
Pulsatility of reproductive hormones: physiological basis and clinical implications.
Baillière's Clin. Endocrinol. Metab., 1:1
- FILICORI M., SANTORO N., MERRIAN G.R., CROWLEY W.F. Jr., (1986)
Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 62:1136
- MAIS V., CETEL N.S., MUSE K.N., QUIGLEY M.E., REID R.L., YEN S.S.C. (1987)
Hormonal dynamics during luteal-follicular transition.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 64:1109
- SAWYER-STEFFAN J.E., LASLEY B.L., HOFF J.D., YEN S.S.C. (1982)
Comparison of in-vitro bioactivity and immunoreactivity of serum LH in normal cyclic and hypogonadal women treated with low doses of LH-RH.

J. Reprod. Fertil., 65:45

- THOMAS C.M.G., SEGERS M.F.G. (1988)
Measurement of Serum hLH: hCG interference evaluated for two hLH-Specific IRMA kits.
Clin. Chem., 34:768
- LOUMAYE E., VANKRIEKEN L., DEPREESTER S., PSALTI I., de COOMAN S., THOMAS K. (1989)
Hormonal changes induced by short-term administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and their consequences for embryo development.
Fertil. and Steril., 51:105
- VERMES I., BONTE H.A., SLUIS VEER G., SCHOEMAKER J. (1991)
Interpretations of five monoclonal immunoassays of Lutropin and Follitropin: effects of normalization with WHO standard.
Clin. Chem., 37:415
- DEMOULIN A., DUBOIS M., GERDAY C., GILLAIN D., LAMBOTTE R., FRANCHIMONT P. (1991)
Variation of luteinizing hormone serum concentration after exogenous human chorionic gonadotropin administration during ovarian stimulation.
Fertil. and Steril., 55:796
- MASSA G., de ZECHER F., VANDERSCHUREN-LODEWKY K. (1992)
Serum levels of immunoreactive Inhibine, FSH and LH in human infants at Preterm and Term Birth.
Biol. of the Neonat., 61:150
- DE HERTOGH R., VANKRIEKEN L., THOMAS K. de GASPARO M. (1992)
Circhoral fluctuations of serum total renin, inhibin and related hormones around the mid-cycle in normal human females.
Hum. Reprod., 7:337

XIX. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS ml	CALIBRATORS ml	SAMPLE(S) CONTROLS ml
Calibrators (0-6) Samples, Controls Tracer	- 0.05	0.1 0.05	- 0.1 0.05
Incubation	1 hour at room temperature with shaking at 700 rpm		
Separation Washing solution Separation Washing solution Separation	- - - - -	aspirate (or decant) 2.0 aspirate (or decant) 2.0 aspirate (or decant)	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>



fr

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

FSH-IRMA

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunologique pour la mesure quantitative *in vitro* de l'Hormone Folliculo-Stimulante (FSH) dans le sérum et le plasma humain.

II. INFORMATIONS GENERALES

A. Nom du produit : DIAsource FSH-IRMA kit

B. Numéro de catalogue : KIP0841 : 96 Tests

C. Fabriqué par : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

La mesure des concentrations en LH et en FSH dans le sérum est essentielle pour l'investigation de la fertilité et, en particulier, des dysfonctionnements de l'axe hypothalamique/hypophysaire/gonadique.

La LH ainsi que la FSH sont sécrétées par les cellules basophiles de l'hypophyse antérieure par suite de la sécrétion de la « gonadotrophine releasing hormone (GnRH) » par des cellules hypothalamiques.

Chez des adultes, les hormones LH et FSH contrôlent des fonctions gonadiques; surtout la gamétogénèse et la sécrétion des stéroïdes.

Les taux circulants de la FSH sont contrôlés par un effet de feed-back négatif sur l'hypothalamus par des hormones stéroïdes et des peptides gonadiques.

IV. PRINCIPES DU DOSAGE

La trousse DIAsource FSH-IRMA est une trousse de dosage radioimmunologique basée sur la séparation en tube recouvert d'anticorps. Mabs1, les anticorps de capture, sont attachés sur la surface basse et interne du tube plastique. Les calibrateurs ou les échantillons ajoutés dans les tubes présenteront dans un premier temps une faible affinité pour Mabs1. L'addition de Mab2, l'anticorps signal marqué avec l'¹²⁵I, complètera le système et déclenchera la réaction immunologique. Suite au lavage, la radioactivité restante liée au tube reflètera la concentration de l'antigène. L'utilisation de plusieurs Mabs différents évite l'hyperspécificité, commune aux IRMA deux-sites.

V. REACTIFS FOURNIS

Reactifs	96 tests Kit	4x96 tests Kit	Code Couleur	Reconstitution
Tubes recouverts avec l'anti FSH (anticorps monoclonal)	2 x 48	8 x 48	Rouge	Prêt à l'emploi
TRACEUR: anti – FSH marquée à l' ¹²⁵ Iodine (anticorps monoclonaux) dans un tampon borate-PO ₄ avec de l'albumine bovine, de l'azide de sodium (<0,1%) et un colorant rouge inactif	1 flacon 5,5 ml 700 kBq	4 flacons 5,5 ml 4x700 kBq	Rouge	Prêt à l'emploi
Calibrateur zéro dans du sérum bovin et du thymol	1 flacon lyophilisé	2 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 2 ml d'eau distillée
Calibrateur N = 1 à 6 (cfr. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans du sérum bovin et du thymol	6 flacons lyophilisés	12 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 1 ml d'eau distillée
Solution de Lavage (Tris-HCl)	1 flacon 10 ml	4 flacons 10 ml	Brun	Diluer 70 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
Contrôles - N = 1 ou 2 dans du plasma humain avec du thymol	2 flacons lyophilisés	4 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée

Note:

1. Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons.
2. 1 mIU de la préparation du calibrateur est équivalent à 1 mIU de 1st IS 92/510.

VI. MATERIELS NON FOURNIS

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

1. Eau distillée
2. Pipettes pour distribuer: 50 µl, 100 µl, 500 µl, 1 ml et 2 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes en plastique est recommandée)
3. Agitateur vortex
4. Agitateur magnétique
5. Agitateur de tubes
6. Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
7. Système d'aspiration (optionnel)
8. Tout compteur gamma capable de mesurer l'¹²⁵I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- Calibrateurs : Reconstituer le calibrateur zéro avec 2 ml d'eau distillée et les autres calibrateurs avec 1 ml d'eau distillée.
- Contrôles : Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.

C. **Solution de Lavage** : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables pendant 3 jours entre 2 et 8 °C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquots devront être réalisés et ceux-ci seront gardés à -20°C, pendant 3 mois. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La solution de lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum ou de plasma doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 24 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Le sérum ou le plasma donne des résultats similaires

$$Y \text{ (sérum)} = 1,00x \text{ (hep. plasma)} + 0,3 \quad r = 0,99 \quad n = 39$$

$$Y \text{ (sérum)} = 1,02x \text{ (EDTA plasma)} + 0,3 \quad r = 0,99 \quad n = 39$$

X. MODE OPERATOIRE

A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousse de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation. Mélangez tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon. Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

B. Mode opératoire

1. Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse, en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts d'anticorps.
2. Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les contrôles et les échantillons. Puis distribuer 100 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
3. Distribuer 50 µl de traceur dans chaque tube.
4. Agiter légèrement le portoir de tube manuellement pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
5. Incuber pendant 1 heure à température ambiante sous agitation continue (700 rpm).
6. Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
7. Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
8. Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale).
9. Laver les tubes à nouveau avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer (ou décanter).
10. Après le dernier lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer (ou décanter) le reste de liquide.
11. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

1. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double. Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les cpm (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration

correspondante en FSH (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l'aide des points de calibration, écarter les valeurs aberrantes.

3. Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.
4. L'analyse informatique des données simplifiera les calculs. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.

XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont fournies pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe de calibration.

FSH-IRMA		cpm	B/T (%)
Activité totale		362200	100
Calibrateur	0,0 mIU/ml 0,7 mIU/ml 3,5 mIU/ml 10,4 mIU/ml 30,0 mIU/ml 100,0 mIU/ml 152,0 mIU/ml	119 1265 2783 8400 28008 102364 160536	0,03 0,35 0,77 2,32 7,73 28,26 44,32

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES

A. Sensibilité

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 0,1 mIU/ml.

B. Spécificité

Des hormones cross-réactives ont été ajoutées à un calibrateur à valeur FSH basse et à un calibrateur à valeur FSH haute. La réponse FSH apparente a été mesurée.

Hormone ajoutée	FSH CAL 1 mIU/ml	FSH CAL 5 mIU/ml
-	0,65	100
LH 300 mIU/ml	1,31	99,16
hCG 300000 mIU/ml	1,46	100,31
TSH 300 µIU/ml	0,98	98,31

C. Précision

INTRA-ESSAI			INTER-ESSAI				
Sérum	N	$\bar{X} \pm SD$ (mIU/ml)	CV (%)	Sérum	N	$\bar{X} \pm SD$ (mIU/ml)	CV (%)
A	10	4,0 ± 0,1	1,8	A	20	15,0 ± 3,0	4,4
B	10	9,0 ± 0,2	2,0	B	20	41,9 ± 1,0	2,4
C	10	50,7 ± 0,5	1,1				

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE RECUPERATION

Echantillon	FSH ajoutée (mIU/ml)	FSH récupérée (mIU/ml)	Récupération (%)
Sérum	6,4	6,2	97
	25,1	23,6	94
	88,8	86,1	97
Hep. plasma	6,4	7	109
	25,1	25,1	100
	88,8	96	108
EDTA plasma	6,4	7,3	114
	25,1	23,6	94
	88,8	84,1	95

TEST DE DILUTION

Echantillon	Dilution	Concent. théorique (mIU/ml)	Concent. Mesurée (mIU/ml)
Sérum 1	1/1	-	8,6
	1/2	4,3	4,1
	1/4	2,2	2
	1/8	1,1	1,1
	1/16	0,5	0,5
Sérum 2	1/1	-	59,6
	1/2	29,8	31,3
	1/4	14,9	16,5
	1/8	7,5	8,2
	1/16	3,7	4,0
	1/32	1,9	2,0
	1/64	0,9	1,0

Les échantillons ont été dilués avec le calibrateur zéro.

E. Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon

Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 45 minutes après que le calibrateur a été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

DELAI

	0'	15'	30'	45'
Sérum 1 (mIU/ml)	1,9	1,7	1,8	1,7
Sérum 2 (mIU/ml)	4,2	4,3	4,2	4,2
Sérum 3 (mIU/ml)	9,6	9,5	9,3	9,3
Sérum 4 (mIU/ml)	52,0	52,0	52,0	53,0

F. Effet crochet

Un échantillon dopé avec du FSH jusqu'à 1000 mIU/ml donne des cpm supérieurs au dernier point de calibration.

XIV. LIMITATIONS

- Les échantillons de patients ayant reçu des préparations d'anticorps monoclonaux de souris pour un diagnostic ou comme traitement peuvent contenir des anticorps humains anti-souris (HAMA). De tels échantillons peuvent montrer des valeurs soit faussement élevées soit faussement basses lorsqu'ils sont analysés avec des trousseaux d'analyses utilisant des anticorps monoclonaux de souris.
- Des anticorps hétérophiles dans le sérum humain peuvent réagir avec le réactif immunoglobulines, interférant ainsi avec les méthodes d'analyse immunologiques *in vitro*. Les patients couramment en contact avec des animaux ou des produits de sérum animal peuvent être sujets à ces interférences. Des valeurs anormales peuvent être observées en cas de présence d'anticorps hétérophiles. Évaluer soigneusement les résultats des patients suspectés d'avoir ces anticorps.
- Si les résultats ne sont pas cohérents avec les autres observations cliniques, des informations supplémentaires doivent être demandées avant de poser le diagnostic.

XV. CONTRÔLE DE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs in duplo des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XVI. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont données à titre d'information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.

L'intervalle est basé sur les percentiles de 2,5% & 97,5%.

Identification	Nombre de sujets	Moyen (mIU/ml)	Intervalle (mIU/ml)
Enfants (0 à 12 ans)			
▪ Garçons	20	0,9	0,1 – 2,3
▪ Filles	20	2,7	0,4 – 12,7
Adolescents (12 à 18 ans)	18	4,5	0,3 – 9,0
Adultes masculins	69	4,2	1,3 – 8,1
Femmes			
▪ Cycles ovariens			
- Phase folliculaire (jour -12 à -6)	34	6,1	1,8 – 9,4
- Jour sommet (jour 0)	48	11,9	3,4 – 33,1
- Phase luteale (jour +6 à +12)	63	4,3	1,2 – 13,4
▪ Postménopausique	53	64,7	27,7 – 93,3

XVII. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de l'¹²⁵I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35,5 keV).

Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux. Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.

Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

L'azide de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azide de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azide dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVIII. BIBLIOGRAPHIE

- CLARKE J.J., CUMMINS J.T. (1987)
Pulsatility of reproductive hormones: physiological basis and clinical implications.
Baillière's Clin. Endocrinol. Metab., 1:1
- FILICORI M., SANTORO N., MERRIAN G.R., CROWLEY W.F. Jr., (1986)
Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 62:1136
- MAIS V., CETEL N.S., MUSE K.N., QUIGLEY M.E., REID R.L., YEN S.S.C. (1987)
Hormonal dynamics during luteal-follicular transition.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 64:1109
- SAWYER-STEFFAN J.E., LASLEY B.L., HOFF J.D., YEN S.S.C. (1982)
- THOMAS C.M.G., SEGERS M.F.G. (1988)
Measurement of Serum hLH: hCG interference evaluated for two hLH-Specific IRMA kits.
Clin. Chem., 34:768
- LOUMAYE E., VANKRIEKEN L., DEPREESTER S., PSALTI I., de COOMAN S., THOMAS K. (1989)
Hormonal changes induced by short-term administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and their consequences for embryo development.
Fertil. and Steril., 51:105
- VERMES I., BONTE H.A., SLUIS VEER G., SCHOEMAKER J. (1991)
Interpretations of five monoclonal immunoassays of Lutropin and Follitropin: effects of normalization with WHO standard.
Clin. Chem., 37:415
- DEMOULIN A., DUBOIS M., GERDAY C., GILLAIN D., LAMBOTTE R., FRANCHIMONT P. (1991)
Variation of luteinizing hormone serum concentration after exogenous human chorionic gonadotropin administration during ovarian stimulation.
Fertil. and Steril., 55:796
- MASSA G., de ZECHER F., VANDERSCHUREN-LODEWK K. (1992)
Serum levels of immunoreactive Inhibine, FSH and LH in human infants at Preterm and Term Birth.
Biol. of the Neonat., 61:150
- DE HERTOGH R., VANKRIEKEN L., THOMAS K. de GASPARO M. (1992)
Circhoral fluctuations of serum total renin, inhibin and related hormones around the mid-cycle in normal human females.
Hum. Reprod., 7:337

XIX. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTALE (ml)	CALIBRATEURS (ml)	ECHANTILLONS CONTROLES (ml)
Calibrateurs (0-6)	-	0,1	-
Echantillons, Contrôles	-	-	0,1
Traceur	0,05	0,05	0,05
Incubation			1 heure à T.A. sous agitation continue
Séparation	-	Aspiration	
Solution de Lavage	-	2,0	
Séparation	-	aspiration	
Solution de Lavage	-	2,0	
Séparation	-	aspiration	
Comptage			Temps de comptage des tubes: 60 secondes

nl



Lees het hele protocol vóór gebruik.

FSH-IRMA

I. BEOOGD GEBRUIK

Immunoradiometrische testkit voor de *in vitro* kwantitatieve bepaling van humaan Follikelstimulerend Hormoon (FSH) in serum en plasma.

II. ALGEMENE INFORMATIE

A. Gedeponeerd handelsmerk: DIAsource FSH-IRMA kit

B. Catalogusnummer: KIP0841 : 96 testen

C. Geproduceerd door: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie kunt u contact opnemen met:

Tel.: +32 (0)10 84 99 11 - Fax: +32 (0)10 84 99 91

III. KLINISCHE ACHTERGROND

De meting van de concentraties van LH en FSH in serum is essentieel om de vruchtbaarheid te onderzoeken en in het bijzonder stoornissen van de hypothalamische/hypofysaire/gonadale as.

Zowel LH als FSH worden afgescheiden door de basofiele cellen van de hypofyse voorkwab ten gevolge de secretie van gonadotropine releasing hormone (GnRH) van hypothalamische cellen.

Bij volwassenen controleren de LH en FSH hormonen geslachtsfuncties; vooral gametogenese en secretie van steroïden.

De circulerende FSH-gehalten worden gecontroleerd door een negatief feedback-effect op de hypothalamus door steroïdale hormonen en gonadale peptiden.

IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

FSH-IRMA van DIAsource is een immunoradiometrische bepaling die gebaseerd is op een scheiding aan de hand van een gecoate buis. Mabs1, de invangantilichamen, zijn onderaan aan het binnenoppervlak van de plastic buis gehecht. Kalibrators of monsters die toegevoegd worden aan de buizen zullen aanvankelijk een lage affiniteit vertonen voor Mabs1. Toevoeging van Mab2, het signaalgenererend antilichaam dat gelabeld werd met ^{125}I , zal het systeem vervolledigen en de immunologische reactie teweegbrengen. Na de wasfase geeft de overblijvende radioactiviteit, gebonden aan de buis, de antigenconcentratie weer. Door het gebruik van meerdere verschillende Mabs wordt hyperspecificiteit vermeden, die gebruikelijk is voor IRMA met 2 Mabs.

V. GELEVERDE REAGENTIA

Reagentia	Kit met 96 testen	Kit met 4x96 testen	Kleur- code	Reconstitutie
 buizen gecoat met anti-FSH (monoklonale antilichamen)	2 x 48	8 x 48	rood	Klaar voor gebruik
Ab ^{125}I TRACER: Anti-FSH (monoklonale antilichamen) gelabeld met ^{125}I in boorzuur-PO ₄ buffer met boven serumalbumine, azide (< 0,1%) een inerte rode kleurstof	1 flacon 5,5 ml 700 kBq	4 flacon 5,5 ml 4x700 kBq	rood	Klaar voor gebruik
CAL 0 Nulkalibrator in boven serum met thymol	1 flacon gevriesdroogd	2 flacons gevriesdroogd	geel	2 ml gedestilleerd water toevoegen
CAL N Kalibrator - N = 1 tot 6 (raadpleeg de flaconetiketten voor de exacte waarden) in boven serum met thymol	6 flacons, gevriesdroogd	12 flacons, gevriesdroogd	geel	1 ml gedestilleerd water toevoegen
WASH SOLN CONC Wasoplossing (Tris-HCl)	1 flacon 10 ml	4 flacons 10 ml	bruin	70 x met gedestilleerd water verdunnen (gebruik een magnetische roerder).
CONTROL N Controles - N = 1 of 2 in humaan plasma met thymol.	2 flacons, gevriesdroogd	4 flacons, gevriesdroogd	zilver	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen

Opmerking : 1. Gebruik Nulkalibrator voor monsterverdunningen
2. 1 mIE van de kalibratorbereiding is gelijk aan 1 mIE van 1st IS 92/510.

VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

De volgende materialen zijn noodzakelijk maar worden niet meegeleverd met de kit:

1. Gedestilleerd water.
2. Pipetten voor een volume van 50 µl, 100 µl, 500 µl, 1 ml en 2 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).
3. Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase.
4. Afzuigsysteem (facultatief).
5. Vortexmenger.
6. Magnetische roerder.
7. Schudder voor de buisjes.
8. Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van ^{125}I (rendement van ten minste 70%).

VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

- A. **Kalibrators:** Reconstitueer de nulkalibrator met 2 ml gedestilleerd water en de andere kalibrators met 1 ml gedestilleerd water.
- B. **Controles:** Reconstitueer de controles met 0,5 ml gedestilleerd water.

C. **Werk-wasoplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 69 eenheden gedestilleerd water toe te voegen aan 1 eenheid wasoplossing (70 x).

Gebruik een magnetische roerder voor de homogenisering. Op het eind van de dag moet de ongebruikte werk-wasoplossing afgevoerd worden.

VIII. OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA

- Vóór opening of reconstitutie zijn alle kitcomponenten houdbaar tot de vervaldatum, zoals vermeld op het etiket, indien zij bewaard werden bij 2 tot 8°C.
- Na reconstitutie zijn de kalibrators en de controles gedurende 3 dagen houdbaar bij 2 tot 8°C. Voor een langere bewaartijd moeten aliquots gemaakt worden, die bij -20°C bewaard moeten worden voor maximaal 3 maanden. Vermijd opeenvolgende cycli van bevriezen en ontdooven.
- Een vers bereide werk-wasoplossing moet op dezelfde dag nog gebruikt worden.
- Na het eerste gebruik is de tracer houdbaar tot de vervaldatum, indien bewaard bij 2 tot 8°C in de oorspronkelijke, goed afgesloten flacon.
- Wijzigingen in het fysieke aspect van kitreagentia kunnen wijzen op instabiliteit of op een kwaliteitsvermindering.

IX. MONSTERAFNAME EN MONSTERBEREIDING

- Serum en plasma moet bij 2 tot 8°C bewaard worden.
- Indien de bepaling niet binnen 24 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze bij -20°C te bewaren.
- Vermijd opeenvolgende cycli van bevriezen en ontdooven.
- Serum en plasma leveren vergelijkbare resultaten op

$$Y \text{ (serum)} = 1,00x \text{ (hep. plasma)} + 0,3 \quad r = 0,99 \quad n = 39$$

$$Y \text{ (serum)} = 1,02x \text{ (EDTA plasma)} + 0,3 \quad r = 0,99 \quad n = 39$$

X. PROCEDURE

A. Opmerkingen bij de procedure

Gebruik de kit of de componenten niet langer dan de aangegeven vervaldatum. Materialen van kits van verschillende loten mogen niet gemengd worden. Laat alle reagentia op kamertemperatuur komen vóór gebruik.

Meng alle reagentia en monsters goed door ze voorzichtig te bewegen of door er voorzichtig mee te draaien. Om kruisbesmetting te vermijden, moet een propere wegwerpbare pipettip gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster.

Pipetten met een grote precisie of geautomatiseerde pipetteerapparatuur zullen de precisie verhogen. Respecteer de incubatietijden.

Bereid een kalibratiecurve voor elke run; men mag geen gegevens gebruiken van voorafgaande runs.

B. Procedure

1. Etiketteer de gecoate buisjes in duplo voor elke kalibrator, voor elk monster, voor elke controle. Etiketteer 2 normale buizen voor de bepaling van de totaaltellingen.
2. Vortex de kalibrators, controles en monsters gedurende korte tijd en pipetteer 100 µl van elk in de desbetreffende buis.
3. Pipetteer 50 µl van de tracer in elke buis.
4. Schud het rek met de buizen voorzichtig met de hand zodat eventueel ingesloten luchtbellen vrijkomen.
5. Incubeer gedurende 1 uur bij kamertemperatuur terwijl er voortdurend mee geschud wordt (700 rpm).
6. Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaaltellingen) op (of decanteer). Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van de gecoate buis komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
7. Was de buizen met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaaltellingen). Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasoplossing.
8. Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaaltellingen) op (of decanteer).
9. Was de buisjes nogmaals met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaaltellingen) en zuig op (of decanteer).
10. Na de laatste wasfase moeten de buisjes gedurende twee minuten rechtop blijven staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
11. Tel de buizen in een gammateller gedurende 60 seconden.

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

- Bereken het gemiddelde voor de bepalingen in duplo.
- Zet de cpm (ordinaat) uit voor elke kalibrator tegen de overeenkomstige FSH -concentratie (abscis) op semi-logaritmisch of lineair millimeterpapier en teken een kalibratiecurve door de kalibratiepunten, waarbij de duidelijke uitschieters verworpen worden.
- Lees door interpolatie de concentratie voor elke controle en voor elk monster op de kalibratiecurve.
- Door computergestuurde gegevensreductie worden deze berekeningen vereenvoudigd.
Indien de resultaten automatisch verwerkt worden, wordt de 4 parameter logistische functie aanbevolen voor de gepaste curve.

XII. KENMERKENDE GEGEVENS

De volgende gegevens dienen enkel ter illustratie en mogen in geen geval gebruikt worden ter vervanging van de real time kalibratiecurve.

FSH-IRMA		cpm	B/T (%)
Totaal telling		362200	100
Kalibrator	0,0 mIE/ml 0,7 mIE/ml 3,5 mIE/ml 10,4 mIE/ml 30,0 mIE/ml 100,0 mIE/ml 152,0 mIE/ml	119 1265 2783 8400 28008 102364 160536	0,03 0,35 0,77 2,32 7,73 28,26 44,32

XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

A. Detectielimiet

Twintig nulkalibrators werden bepaald, samen met een reeks andere kalibrators. De detectielimiet, omschreven als de schijnbare concentratie van twee standaarddeviaties boven de gemiddelde tellingen bij nulbinding, bedroeg 0,1 mIE/ml.

B. Specificiteit

Kruisreagerende hormones werden toegevoegd aan kalibrators met lage en hoge waarden. De schijnbare respons van FSH werd gemeten.

Toegevoegd hormoon	FSH CAL 1 mIE/ml		FSH CAL 5 mIE/ml	
	-	0,65	100	99,16
LH 300 mIE/ml		1,31		
hCG 300000 mIE/ml		1,46		100,31
TSH 300 µIE/ml		0,98		98,31

C. Precisie

BINNEN EEN TEST				TUSSEN TESTEN			
Serum	N	$\bar{X} \pm SD$ (mIE/ml)	VC (%)	Serum	N	$\bar{X} \pm SD$ (mIE/ml)	VC (%)
A	10	4,0 ± 0,1	1,8	A	20	15,0 ± 3,0	4,4
B	10	9,0 ± 0,2	2,0	B	20	41,9 ± 1,0	2,4
C	10	50,7 ± 0,5	1,1				

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

RECOVERY -TEST

Monster	Toegevoegd FSH (mIE/ml)	Recovery van FSH (mIE/ml)	Recovery (%)
Serum	6,4 25,1 88,8	6,2 23,6 86,1	97 94 97
Heparine plasma	6,4 25,1 88,8	7 25,1 96	109 100 108
EDTA plasma	6,4 25,1 88,8	7,3 23,6 84,1	114 94 95

VERDUNNINGSTEST

Monster	Verdunning	Theoretische concentratie (mIE/ml)	Concentratie die bepaald werd (mIE/ml)
Serum 1	1/1	-	8,6
	1/2	4,3	4,1
	1/4	2,2	2
	1/8	1,1	1,1
	1/16	0,5	0,5
Serum 2	1/1	-	59,6
	1/2	29,8	31,3
	1/4	14,9	16,5
	1/8	7,5	8,2
	1/16	3,7	4,0
	1/32	1,9	2,0
	1/64	0,9	1,0

De monsters zijn verduld met Nulkalibrator.

F. TijdsSpanne tussen de laatste kalibrator en distributie van het monster

Zoals hieronder weergegeven wordt, blijven de resultaten van de bepaling nauwkeurig, zelfs wanneer een monster 45 minuten na toevoeging van de kalibrator in de gecoate tubes gepipetteerd wordt.

TIJDSPANNE

	0'	15'	30'	45'
Serum 1 (mIE/ml)	1,9	1,7	1,8	1,7
Serum 2 (mIE/ml)	4,2	4,3	4,2	4,2
Serum 3 (mIE/ml)	9,6	9,5	9,3	9,3
Serum 4 (mIE/ml)	52,0	52,0	52,0	53,0

G. "Hook"-effect

Een monster, dat met FSH gespitket werd tot 1000 mIE/ml, levert hogere tellingen op dan het laatste kalibratiepunt.

XIV. BEPERKINGEN

- Specimens van patiënten die voor de diagnose of behandeling preparaten hebben gekregen van monoklonale antilichamen van muizen kunnen humane anti-muis-antilichamen (HAMA) bevatten. Dergelijke specimens kunnen ofwel vals-verhoogde of vals-verlaagde waarden vertonen wanneer ze met testkits worden getest waarbij gebruik wordt gemaakt van monoklonale antilichamen van muizen.
- Heterofiele antilichamen in humaan serum kunnen reageren met reagensimmunoglobulinen, wat een effect kan hebben op in vitro immunoassays. Patiënten die regelmatig aan dieren of dierlijke serumproducten worden blootgesteld, kunnen vatbaar zijn voor een dergelijk effect, terwijl afwijkende waarden kunnen worden waargenomen wanneer heterofiele antilichamen aanwezig zijn. Beoordeel de resultaten zorgvuldig van patiënten van wie vermoed wordt dat ze deze antilichamen hebben. Als de resultaten niet overeenstemmen met andere klinische waarnemingen moet bijkomende informatie worden verkregen voordat de diagnose wordt gesteld.

XV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

D. Nauwkeurigheid

- Indien de resultaten, die verkregen werden voor controle 1 en/of controle 2, niet binnen het bereik vallen zoals vermeld op het flaconetiket, dan mogen de resultaten niet gebruikt worden tenzij een bevredigende uitleg gegeven wordt voor de discrepantie.
- Indien gewenst, kan elk laboratorium zijn eigen pools voor controlemonsters maken, die dan in aliquots bewaard moeten worden in de diepvriezer.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van monsters moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.

XVI. REFERENTIE-INTERVALS

Deze waarden worden slechts als leidraad gegeven; elk laboratorium moet zijn eigen normaal bereik van waarden uitmaken.

Bereik gebaseerd op 2.5% & 97.5% percentielen.

Identificatie	Aantal subjecten	Gemiddelde (mIE/ml)	Bereik (mIE/ml)
Kinderen (0 tot 12 jaar)			
▪ jongens	20	0,9	0,1 – 2,3
▪ meisjes	20	2,7	0,4 – 12,7
Pubers (12 tot 18 jaar)			
	18	4,5	0,3 – 9,0
Mannelijke volwassenen			
	69	4,2	1,3 – 8,1
Vrouwen			
▪ Ovulatiecycli			
- Folliculaire fase (dag -12 tot -6)	34	6,1	1,8 – 9,4
- Ovulatiepiek (dag 0)	48	11,9	3,4 – 33,1
- Luteale fase (dag +6 tot +12)	63	4,3	1,2 – 13,4
▪ Postmenopausaal	53	64,7	27,7 – 93,3

XVII. VOORZORGSMATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.

Deze kit bevat ^{125}I (halfwaardetijd: 60 dagen), dat ioniserende X- (28 keV) en γ -stralen (35.5 keV) uitzendt.

Dit radioactieve product mag enkel overhandigd worden aan en gebruikt worden door bevoegd personeel; ontvangst, opslag, gebruik en overdracht van radioactieve producten zijn onderworpen aan de wetgeving van het land van de eindgebruiker. In geen geval mag het product toegediend worden aan mensen of dieren.

Alle handelingen met radioactief materiaal moeten plaatsvinden in een daartoe bestemde ruimte, waar uitsluitend bevoegd personeel toegelaten wordt. Een logboek met ontvangst en opslag van radioactieve materialen moet worden bijgehouden in het laboratorium. Laboratoriumapparatuur en glaswerk, dat eventueel gecontamineerd werd met radioactieve bestanddelen, moeten worden gesegregeerd om kruisbesmetting van verschillende radioisotopen te vermijden.

Als radioactief materiaal gemorst werd, dan moet dat onmiddellijk gereinigd worden in overeenstemming met de procedure voor stralingsveiligheid. Het radioactieve afval moet worden weggegooid in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften en richtlijnen van de autoriteiten waaronder het laboratorium valt. Naleving van de basisregels van stralingsveiligheid zorgt voor een juiste bescherming.

De componenten, afkomstig van menselijk bloed, in deze kit werden getest door in Europa goedgekeurde en/of door de Amerikaanse FDA goedgekeurde methoden op aanwezigheid van HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en 2 en gaven een negatief resultaat. Geen enkele bekende methode kan echter volledige garantie bieden dat derivaten van menselijk bloed geen hepatitis, aids of andere infecties overdragen. Daarom moet men reagentia, serum- of plasmamonsters behandelen in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures.

Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel infectieus materiaal.

Vermijd dat de reagentia (natriumazide als conserveermiddel) in contact komen met de huid. Azide in deze kit kan reageren met lood en koper in de afvoerleidingen en op die manier zeer explosive metaalaziden vormen. Tijdens de wasfase moeten de afvoerleidingen ruimschoots met water nagespoeld worden om ophoping van azide te vermijden.

Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkruimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen.

1. CLARKE J.J., CUMMINS J.T. (1987)
Pulsatility of reproductive hormones: physiological basis and clinical implications.
Bailliére's Clin. Endocrinol. Metab., 1:1
2. FILICORI M., SANTORO N., MERRIAN G.R., CROWLEY W.F. Jr., (1986)
Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 62:1136
3. MAIS V., CETEL N.S., MUSE K.N., QUIGLEY M.E., REID R.L., YEN S.S.C. (1987)
Hormonal dynamics during luteal-follicular transition.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 64:1109
4. SAWYER-STEFFAN J.E., LASLEY B.L., HOFF J.D., YEN S.S.C. (1982)
Comparison of in-vitro bioactivity and immunoreactivity of serum LH in normal cyclic and hypogonadal women treated with low doses of LH-RH.
J. Reprod. Fertil., 65:45
5. THOMAS C.M.G., SEGERS M.F.G. (1988)
Measurement of Serum hLH: hCG interference evaluated for two hLH-Specific IRMA kits.
Clin. Chem., 34:768
6. LOUMAYE E., VANKRIEKEN L., DEPREESTER S., PSALTI I., de COOMAN S., THOMAS K. (1989)
Hormonal changes induced by short-term administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and their consequences for embryo development.
Fertil. and Steril., 51:105
7. VERMES I., BONTE H.A., SLUIS VEER G., SCHOE MAKER J. (1991)
Interpretations of five monoclonal immunoassays of Lutropin and Follitropin: effects of normalization with WHO standard.
Clin. Chem., 37:415
8. DEMOULIN A., DUBOIS M., GERDAY C., GILLAIN D., LAMBOTTE R., FRANCHIMONT P. (1991)
Variation of luteinizing hormone serum concentration after exogenous human chorionic gonadotropin administration during ovarian stimulation.
Fertil. and Steril., 55:796
9. MASSA G., de ZECHER F., VANDERSCHUREN-LODEWYK K. (1992)
Serum levels of immunoreactive Inhibine, FSH and LH in human infants at Preterm and Term Birth.
Biol. of the Neonat., 61:150
10. DE HERTOGH R., VANKRIEKEN L., THOMAS K. de GASPARO M. (1992)
Circhoral fluctuations of serum total renin, inhibin and related hormones around the mid-cycle in normal human females.
Hum. Reprod., 7:337

XVIII. BIBLIOGRAFIE

XIX. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	TOTAAL-TELLINGEN (ml)	KALIBRA-TORS (ml)	MONSTER(S) CONTROLES (ml)
Kalibrators (0 -6) Monsters, Controles Tracer	- - 0,05	0,1 - 0,05	- 0,1 0,05
Incubatie	1 uur bij kamertemperatuur terwijl er voortdurend mee geschud wordt.		
Scheidung Werk-wasoplossing Scheidung Werk-wasoplossing Scheidung	- - - - -	opzuigen (of decanteer) 2,0 opzuigen (of decanteer) 2,0 opzuigen (of decanteer)	
Telling	Tel de buisjes gedurende 60 seconden		



de

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

FSH-IRMA

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem follikelstimulierendes Hormon (FSH) in Serum und Plasma.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

A. Handelsbezeichnung : DIAsource FSH-IRMA Kit

B. Katalognummer : KIP0841 : 96 Tests

C. Hergestellt von: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75
E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

Die Messung der LH und FSH-Konzentrationen im Serum ist bei der Untersuchung der Fertilität und vor allem von Störungen der Hypothalamus/Hypophyse/Gonaden-Achse unerlässlich.

LH und FSH werden nach Ausschüttung von Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) durch den Hypothalamus in den basophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet.

Beim Erwachsenen steuern die Hormone LH und FSH die Gonadenfunktionen, vor allem die Gametogenese und die Steroidsekretion.

Zirkulierende FSH-Niveaus werden durch eine negative Rückkopplung mit dem Hypothalamus durch Steroidhormone und Gonadenpeptide gesteuert.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DiaSource FSH-IRMA ist ein Radioimmuno-Assay in beschichteten Röhrchen. Mabs1, die Fänger-Antikörper, haften an der unteren inneren Oberfläche des Plastikröhrechens. In die Röhrchen zugegebene Kalibratoren oder Proben zeigen zuerst eine niedrige Affinität zu Mabs1. Zugabe von Mab2, des mit ^{125}I markierten Signalantikörpers, vervollständigt das System und triggert die immunologische Reaktion. Nach dem Waschen gibt die verbleibende, an den Röhrchen haftende Radioaktivität die Antigenkonzentration wieder. Die Verwendung einiger unterschiedlicher Mabs vermeidet die sonst bei zweiseitigem IRMA auftretende Hyperspezifität.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Test Kit	4x96 Test Kit	Farb Code	Rekonstitution
 Mit anti FSH-beschichtete Röhrchen (monoklonale Antikörper)	2 x 48	8 x 48	rot	gebrauchsfertig
 TRACER: ^{125}I odmarkierter Anti-FSH (monoklonale Antikörper) in Borat-PO ₄ -puffer mit Rinderserumalbumin, Azid (<0,1%) und inertem roten Farbstoff	1 Gefäß 5,5 ml 700 kBq	4 Gefäße 5,5 ml 4x700 kBq	rot	gebrauchsfertig
 Null Kalibrator in Rinderserum mit Thymol	1 Gefäß lyophil.	2 Gefäße lyophil.	gelb	2 ml dest. Wasser zugeben
 Kalibrator - N = 1 to 6 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Rinderserum mit Thymol	6 Gefäße lyophil.	12 Gefäße lyophil.	gelb	1 ml dest. Wasser zugeben
 Waschlösung (Tris-HCl)	1 Gefäß 10 ml	4 Gefäße 10 ml	braun	70 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
 Kontrollen - N = 1 or 2 Humanplasma mit Thymol	2 Gefäße lyophil.	4 Gefäße lyophil.	silber	0,5 ml dest. Wasser zugeben

Bemerkung:

1. Benutzen Sie Null Kalibrator zur Probenverdünnung.
2. 1 mIU der Standardzubereitung ist äquivalent zu 1 mIU 1st IS 92/510.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, wird aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

1. Dest. Wasser
2. Pipetten: 50 µl, 100 µl, 500 µl, 1 ml und 2 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Wegwerf-Plastikspitzen wird empfohlen)
3. 5 ml automatische Spritze (Cornwall Typ) zum Waschen
4. Absaugsystem (optional)
5. Vortex Mixer
6. Magnetrührer
7. Schüttler für Röhrchen
8. Jegl. Gamma-Counter, der ^{125}I messen kann, kann verwendet werden. (minimal Yield 70%)

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. **Kalibratoren**: Rekonstituieren Sie den Null Kalibrator mit 2 ml dest. Wasser, die anderen Kalibratoren mit 1 ml dest. Wasser.
- B. **Kontrollen**: Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. Wasser.
- C. **Waschlösung**: Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (70x) mit 69 Anteilen dest. Wasser zu.

Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Verwerfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2°C bis 8°C stabil.
- Nach der Rekonstitution sind die Kalibratoren und Kontrollen bei 2°C bis 8°C 3 Tage stabil. Aliquots müssen bei längerer Aufbewahrung bei -20°C eingefroren werden, dann sind sie 3 Monate haltbar. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist der Tracer bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2° bis 8°C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serum- oder Plasmaproben müssen bei 2 – 8°C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, ist die Aufbewahrung bei -20°C erforderlich.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Serum- oder Plasmaproben liefern ähnliche Ergebnisse

$$Y (\text{Serum}) = 1,00x (\text{hep. Plasma}) + 0,3 \quad r = 0,99 \quad n = 39$$

$$Y (\text{Serum}) = 1,02x (\text{EDTA Plasma}) + 0,3 \quad r = 0,99 \quad n = 39$$

X. DURCHFÜHRUNG

A. Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum. Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur.
 Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Wegwerf-Pipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
 Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.
 Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Standardkurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

B. Durchführung

1. Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
2. Vortexen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben kurz und geben Sie jeweils 100 µl in ihre Röhrchen.
3. Geben Sie 50 µl des Tracers in jedes Röhrchen.
4. Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
5. Inkubieren Sie 1 Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (700 rpm)
6. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantern Sie) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
7. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantern Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
8. Saugen Sie den Inhalt jeden Röhrchens (außer Gesamtaktivität) ab.
9. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantern Sie).
10. Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
11. Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter 60 Sekunden aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
2. Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration FSH (Abszisse) und zeichnen Sie eine Standardkurve durch die Standardpunkte, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
3. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Standardkurve.
4. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4 Parameter“-Kurvenfunktion.

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.
Bereich auf basis der 2,5% und 97,5% Perzentile

Identifikation	Anzahl von Personen	Mittelwert (mIU/ml)	Bereich (mIU/ml)
Kinder (0 bis 12 Jahre)			
▪ Jungen	20	0,9	0,1 – 2,3
▪ Mädchen	20	2,7	0,4 – 12,7
Jugendliche (12 bis 18 Jahre)			
	18	4,5	0,3 – 9,0
Erwachsene Männer			
	69	4,2	1,3 – 8,1
Frauen			
▪ Ovulationszyklen			
- Follikelsphase (Tag -12 bis -6)	34	6,1	1,8 – 9,4
- Ovulationsgipfel (Tag 0)	48	11,9	3,4 – 33,1
- Lutealphase (Tag +6 bis +12)	63	4,3	1,2 – 13,4
▪ Postmenopausal	53	64,7	27,7 – 93,3

XVII. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ^{125}I (Halbwertzeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35,5 keV) Strahlungen emittiert.

Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausrüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern. Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde.

Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiös betrachtet werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflussrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschrifte den Abfluss gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

Bitte rauchen, trinken, essen oder wenden Sie Kosmetika nicht in Ihrem Arbeitsbereich an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

XVIII. LITERATUR

- CLARKE J.J., CUMMINS J.T. (1987)
Pulsatility of reproductive hormones: physiological basis and clinical implications.
Baillière's Clin. Endocrinol. Metab., 1:1
- FILICORI M., SANTORO N., MERRIAN G.R., CROWLEY W.F. Jr., (1986)
Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 62:1136

- MAIS V., CETEL N.S., MUSE K.N., QUIGLEY M.E., REID R.L., YEN S.S.C. (1987)
Hormonal dynamics during luteal-follicular transition.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 64:1109
- SAWYER-STEFFAN J.E., LASLEY B.L., HOFF J.D., YEN S.S.C. (1982)
Comparison of in-vitro bioactivity and immunoreactivity of serum LH in normal cyclic and hypogonadal women treated with low doses of LH-RH.
J. Reprod. Fertil., 65:45
- THOMAS C.M.G., SEGERS M.F.G. (1988)
Measurement of Serum hLH: hCG interference evaluated for two hLH-Specific IRMA kits.
Clin. Chem., 34:768
- LOUMAYE E., VANKRIEKEN L., DEPREESTER S., PSALTI I., de COOMAN S., THOMAS K. (1989)
Hormonal changes induced by short-term administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and their consequences for embryo development.
Fertil. and Steril., 51:105
- VERMES I., BONTE H.A., SLUIS VEER G., SCHOEMAKER J. (1991)
Interpretations of five monoclonal immunoassays of Lutropin and Follitropin: effects of normalization with WHO standard.
Clin. Chem., 37:415
- DEMOULIN A., DUBOIS M., GERDAY C., GILLAIN D., LAMBOTTE R., FRANCHIMONT P. (1991)
Variation of luteinizing hormone serum concentration after exogenous human chorionic gonadotropin administration during ovarian stimulation.
Fertil. and Steril., 55:796
- MASSA G., de ZECHER F., VANDERSCHUREN-LODEWKY K. (1992)
Serum levels of immunoreactive Inhibine, FSH and LH in human infants at Preterm and Term Birth.
Biol. of the Neonat., 61:150
- DE HERTOGH R., VANKRIEKEN L., THOMAS K. de GASPARO M. (1992)
Circhoral fluctuations of serum total renin, inhibin and related hormones around the mid-cycle in normal human females.
Hum. Reprod., 7:337

XIX. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT-AKTIVITÄT (ml)	KALIBRATOREN (ml)	PROBE(N) KONTROLLEN (ml)
Kalibratoren (0-6) Proben, Kontrollen Tracer	- - 0,05	0,1 - 0,05	- 0,1 0,05
Inkubation			1 Std. bei RT unter ständigem Schütteln
Trennung Waschlösung Trennung Waschlösung Trennung	- - - -	absaugen (oder dekant.) 2,0 absaugen (oder dekant.) 2,0 absaugen (oder dekant.)	
Gamma Counter			60 Sekunden messen



es

Leer el protocolo completo antes de usar.

FSH-IRMA

I. INSTRUCCIONES DE USO

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa *in vitro* de la Hormona Foliculo Estimulante (FSH) humana en suero y plasma.

II. INFORMACIÓN GENERAL

A. Nombre: DIAsource FSH-IRMA Kit

B. Número de Catálogo: KIP0841 : 96 Tests

C. Fabricado por: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

La medición de las concentraciones de la LH y de la FSH en suero es esencial para la investigación de la fertilidad y particularmente de disfunciones del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal.

La LH y la FSH son segregadas por las células basófilas de la glándula pituitaria anterior a causa de la secreción de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por células hipotalámicas.

En adultos, las hormonas LH y FSH controlan funciones gonadales; especialmente la gametogénesis y la secreción de esteroides.

Los niveles circulantes de FSH son controlados por un efecto de feed-back negativo sobre el hipotálamo por hormonas esteroides y péptidos gonadales.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

FSH-IRMA de DIAsource es un radioinmunoensayo basado en la separación en tubo recubierto de anticuerpos. Mabs1, los anticuerpos de captura, se adhieren en la parte inferior inferior de las paredes del tubo de poliestireno. Al principio calibradores o muestras añadidos en los tubos presentarán poca afinidad con Mabs1. La adición de Mab2, el anticuerpo señal marcado con ^{125}I , completará el sistema y activará la reacción inmunológica. Después del lavado, la radiactividad restante adherida al tubo, refleja la concentración del antígeno. El uso de varios Mabs distintos evita hiperespecificidad, propio de IRMA dos-puntos.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	96 tests Kit	4x96 tests Kit	Código de Color	Reconstitución
Tubos recubiertos con anti-FSH (anticuerpos monoclonales)	2 x 48	8 x 48	rojo	Listo para uso
Ab ^{125}I TRAZADOR: anti-FSH (anticuerpos monoclonales) marcado con ^{125}I en tampon borato-PO ₄ con albúmina bovina, azida (<0,1%) y un colorante rojo inerte	1 vial 5,5 ml 700 kBq	4 viales 5,5 ml 4x700 kBq	rojo	Listo para uso
CAL 0 Calibrador cero en suero bovino y thymol	1 vial liofilizado	2 viales liofilizados	amarillo	Añadir 2 ml de agua destilada
CAL N Calibradores N = 1 a 6 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en suero bovino y thymol	6 viales liofilizados	12 viales liofilizados	amarillo	Añadir 1 ml de agua destilada
WASH SOLN CONC Solución de lavado (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	4 viales 10 ml	marrón	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
CONTROL N Controles - N = 1 o 2 en plasma humano y thymol.	2 viales liofilizados	4 viales liofilizados	plateado	Añadir 0,5 ml de agua destilada

Nota: 1. Para diluciones de muestras utilizar Calibrador cero.
 2. 1 mUI de la preparación del calibrador es equivalente a 1 mUI 1st IS 92/510.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

El material mencionado a continuación es necesario y no está incluido en el kit

1. Agua destilada
2. Pipetas de 50 μl , 100 μl , 500 μl , 1ml y 2 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Vortex
4. Agitador magnético
5. Agitador de tubos
6. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
7. Sistema de aspiración (opcional)
8. Contador de radiaciones gamma para medir ^{125}I (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

- A. **Calibradores:** Reconstituir el calibrador cero con 2 ml de agua destilada y los otros calibradores con 1 ml de agua destilada.
- B. **Controles:** Reconstituir los controles con 0,5 ml de agua destilada.

- C. **Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Despues de su reconstitución los calibradores y controles son estables durante 3 días a 2 – 8°C. Para periodos más largos, alícuotar y guardar a – 20°C como mucho 3 meses. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Despues del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a 2-8°C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero ó plasma deben ser guardadas a 2 – 8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 24hrs., almacenar las muestras a –20°C.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- Suero ó plasma presentan resultados similares

$$Y (\text{Suero}) = 1,00x (\text{hep. plasma}) + 0,3 \quad r = 0,99 \quad n = 39$$

$$Y (\text{Suero}) = 1,02x (\text{EDTA plasma}) + 0,3 \quad r = 0,99 \quad n = 39$$

X. PROTOCOLO

A. Notas de manejo

No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente numero de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.

Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.

El uso de pipetas de precisión ó equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.

Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

B. Protocolo

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada uno de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
2. Agitar brevemente los calibradores, controles y muestras y dispensar 100 μl de cada uno en sus respectivos tubos.
3. Dispensar 50 μl del trazador en cada tubo, incluyendo los tubos no recubiertos destinados a las Cuentas Totales.
4. Agitar suavemente la gradilla de tubos para eliminar cualquier burbuja pegada de las paredes de los tubos.
5. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante (700 rpm).
6. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
7. Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado.
8. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales)
9. Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar).
10. Despues del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el liquido restante.
11. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CALCULO DE RESULTADOS

1. Calcular la media de los duplicados.
2. Representar en un gráfico semilogarítmico o lineal las c.p.m. (ordenada) de cada calibrador frente a las concentraciones de FSH (abscisa) y dibujar una curva de calibración por los puntos de calibración, rechazando los duplicados discordantes.

- Leer la concentración para cada control y muestra por interpolación en la curva de calibración.
- Métodos computarizados de proceso de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de cálculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica “4 parámetros”.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados como una calibración real.

FSH-IRMA		cpm	B/T (%)
Cuentas Totales		362200	100
Calibrador	0,0 mUI/ml	119	0,03
	0,7 mUI/ml	1265	0,35
	3,5 mUI/ml	2783	0,77
	10,4 mUI/ml	8400	2,32
	30,0 mUI/ml	28008	7,73
	100,0 mUI/ml	102364	28,26
	152,0 mUI/ml	160536	44,32

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Límite de detección

Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores.

El límite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares sobre la media de enlace del calibrador cero, fue de 0,1 mUI/ml.

B. Especificidad

Hormonas con reacción cruzada se añadieron a un calibrador con valor FSH bajo y a un calibrador con valor FSH elevado. La respuesta aparente fue medida.

Hormona añadida	FSH CAL 1		FSH CAL 5	
	mUI/ml	mUI/ml	mUI/ml	mUI/ml
-	0,65	100		
LH 300 mUI/ml	1,31	99,16		
hCG 300000 mUI/ml	1,46	100,31		
TSH 300 µUI/ml	0,98	98,31		

C. Precisión

PRECISIÓN INTRA-ENSAYO

Suero	N	$\bar{X} \pm SD$ (mUI/ml)	CV (%)	Suero	N	$\bar{X} \pm SD$ (mUI/ml)	CV (%)
A	10	4,0 ± 0,1	1,8	A	20	15,0 ± 3,0	4,4
B	10	9,0 ± 0,2	2,0	B	20	41,9 ± 1,0	2,4
C	10	50,7 ± 0,5	1,1				

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DILUCIÓN

Muestra	Dilución	Concent. Teórica (mUI/ml)	Concent. Medida (mUI/ml)
Suero 1	1/1	-	8,6
	1/2	4,3	4,1
	1/4	2,2	2
	1/8	1,1	1,1
	1/16	0,5	0,5
Suero 2	1/1	-	59,6
	1/2	29,8	31,3
	1/4	14,9	16,5
	1/8	7,5	8,2
	1/16	3,7	4,0
	1/32	1,9	2,0
	1/64	0,9	1,0

Las muestras fueron diluidas con calibrador cero.

TEST DE RECUPERACIÓN

Muestra	FSH añadido (mUI/ml)	FSH Recuperado (mUI/ml)	Recuperado (%)
Suero	6,4	6,2	97
	25,1	23,6	94
	88,8	86,1	97
Hep. plasma	6,4	7	109
	25,1	25,1	100
	88,8	96	108
EDTA plasma	6,4	7,3	114
	25,1	23,6	94
	88,8	84,1	95

E. Tiempo de espera entre la dispensación del último calibrador y la de la muestra

Como se muestra a continuación la precisión del ensayo se mantiene incluso en el caso de dispensar la muestra 45 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos cubiertos.

TIEMPO DE ESPERA

	0'	15'	30'	45'
Suero 1 (mUI/ml)	1,9	1,7	1,8	1,7
Suero 2 (mUI/ml)	4,2	4,3	4,2	4,2
Suero 3 (mUI/ml)	9,6	9,5	9,3	9,3
Suero 4 (mUI/ml)	52,0	52,0	52,0	53,0

F. Efecto gancho

Una muestra con FSH de 1000 mUI/ml presenta cuentas más elevadas que el último punto de calibración.

XIV. LIMITACIONES

- Es posible que las muestras de pacientes que han recibido preparaciones de anticuerpos monoclonales de ratón para diagnóstico o terapia, puedan contener anticuerpos humanos anti ratón (HAMA). Los resultados de estas muestras analizadas con kits que utilizan anticuerpos monoclonales de ratón, pueden dar valores falsamente aumentados o disminuidos.
- Los anticuerpos heterófilos en el suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas que forman parte del reactivo, interfiriendo con los inmuunoensayos in vitro.

Pacientes que en forma rutinaria están en contacto con animales o productos derivados de suero animal, pueden tender a presentar esta interferencia y se pueden observar valores anómalos en caso de haber presencia de anticuerpos heterófilos. Evalúe cuidadosamente los resultados de aquellos pacientes sospechosos de tener estos anticuerpos. Si los resultados no concuerdan con otras observaciones clínicas, será necesario obtener información adicional antes de hacer un diagnóstico.

XV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, lo cuales se guardan en alvéolos congelados.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados de los duplicados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XVI. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores solamente sirven de guía; cada laboratorio tiene que establecer sus propios valores normales.

Alcance basados en percentiles de 2,5% & 97,5%

Identificación	Número de sujetos	Media (mUI/ml)	Rango (mUI/ml)
Niños (0 a 12 años)			
▪ Muchachos	20	0,9	0,1 – 2,3
▪ Muchachas	20	2,7	0,4 – 12,7
Púberes (12 a 18 años)	18	4,5	0,3 – 9,0
Adultos masculinos	69	4,2	1,3 – 8,1
Mujeres			
▪ Ciclo ovulatorio			
- Fase folicular (día -12 a -6)	34	6,1	1,8 – 9,4
- Pico ovulatorio (día 0)	48	11,9	3,4 – 33,1
- Fase luteínica (día +6 al +12)	63	4,3	1,2 – 13,4
▪ Postmenopáusicas	53	64,7	27,7 – 93,3

XVII. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I^{125} (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35,5 keV) ionizantes.

Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.

Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.

Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes contenido substancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.

Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.

No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetejar con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVIII. BIBLIOGRAFIA

- CLARKE J.J., CUMMINS J.T. (1987)
Pulsatility of reproductive hormones: physiological basis and clinical implications.
Baillière's Clin. Endocrinol. Metab., 1:1
- FILICORI M., SANTORO N., MERRIAN G.R., CROWLEY W.F. Jr., (1986)
Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 62:1136
- MAIS V., CETEL N.S., MUSE K.N., QUIGLEY M.E., REID R.L., YEN S.S.C. (1987)
Hormonal dynamics during luteal-follicular transition.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 64:1109
- SAWYER-STEFFAN J.E., LASLEY B.L., HOFF J.D., YEN S.S.C. (1982)
Comparison of in-vitro bioactivity and immunoreactivity of serum LH in normal cyclic and hypogonadal women treated with low doses of LH-RH.
J. Reprod. Fertil., 65:45

- THOMAS C.M.G., SEGERS M.F.G. (1988)
Measurement of Serum hLH: hCG interference evaluated for two hLH-Specific IRMA kits.
Clin. Chem., 34:768
- LOUMAYE E., VANKRIEKEN L., DEPREESTER S., PSALTI I., de COOMAN S., THOMAS K. (1989)
Hormonal changes induced by short-term administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and their consequences for embryo development.
Fertil. and Steril., 51:105
- VERMES I., BONTE H.A., SLUIS VEER G., SCHOOEMAKER J. (1991)
Interpretations of five monoclonal immunoassays of Lutropin and Follitropin: effects of normalization with WHO standard.
Clin. Chem., 37:415
- DEMOULIN A., DUBOIS M., GERDAY C., GILLAIN D., LAMBOTTE R., FRANCHIMONT P. (1991)
Variation of luteinizing hormone serum concentration after exogenous human chorionic gonadotropin administration during ovarian stimulation.
Fertil. and Steril., 55:796
- MASSA G., de ZECHER F., VANDERSCHUREN-LODEWYK K. (1992)
Serum levels of immunoreactive Inhibine, FSH and LH in human infants at Preterm and Term Birth.
Biol. of the Neonat., 61:150
- DE HERTOGH R., VANKRIEKEN L., THOMAS K. de GASPARO M. (1992)
Circhoral fluctuations of serum total renin, inhibin and related hormones around the mid-cycle in normal human females.
Hum. Reprod., 7:337

XIX. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (μ l)	CALIBRADO RES (μ l)	MUESTRA(S) CONTROL(S) (μ l)
Calibradores (0 al 6)	-	100	-
Muestras, controles	-	-	100
Trazador	50	50	50
Incubación	1 hora a T.A. en agitación constante		
Separación	-	aspirar	
Solución de Lavado	-	2,0 ml	
Separación	-	aspirar	
Solución de Lavado	-	2,0 ml	
Separación	-	aspirar	
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

CE

el

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

FSH-IRMA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Κιτ ανοσοραδιομετρικού προσδιορισμού για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης θυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) στον ορό και το πλάσμα.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. Εμπορική ονομασία: Κιτ FSH-IRMA της DIAsource
- B. Αριθμός καταλόγου: KIP0841: 96 προσδιορισμοί
- C. Κατασκευάζεται από την: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Φαξ: +32 (0)10 84.99.91

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

Η μέτρηση των συγκεντρώσεων της LH και FSH στον ορό είναι σημαντική για τη διερεύνηση της γονιμότητας και ειδικά διαταραχών του άξονα υποθάλαμος/υπόφυση/γονάδες. Τόσο η LH όσο και η FSH απεκκρίνονται από τα βασεόφιλα κύτταρα του προσθίου τμήματος της υπόφυσης ως αποτέλεσμα της απέκκρισης της εκλυτικής ορμόνης της γοναδοτροπίνης (GnRH) από κύτταρα του υποθαλάμου.

Στους ενηλίκους, οι ορμόνες LH και FSH ελέγχουν τις γοναδικές λειτουργίες, κυρίως τη γαμετογένεση και την απέκκριση στεροειδών.

Τα επίπεδα κυκλοφορίας της FSH ελέγχονται από ένα φαινόμενο αρνητικής ανατροφοδότησης στον υποθάλαμο από στεροειδείς ορμόνες και γοναδικά πεπτίδια.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η εξέταση FSH-IRMA της DIAsource είναι ένας ανοσοραδιομετρικός προσδιορισμός που βασίζεται σε διαχωρισμό επιστρωμένων σωληναρίων. Τα Mabs1, τα αντισώματα σύλληψης, προσκολλώνται στην κάτω και εσωτερική επιφάνεια του πλαστικού σωληναρίου. Οι βαθμονομητές ή τα δείγματα που προστίθενται στα σωληνάρια εμφανίζουν κατ' αρχήν χαμηλή συγγένεια προς τα Mabs1. Προσθήκη Mab2, τον αντισώματος σηματοδότησης που είναι σημασμένο με ^{125}I , θα ολοκληρώσει το σύστημα και θα πυροδοτήσει την ανοσολογική αντίδραση. Μετά την πλήρη, η υπολειπόμενη ραδιενέργεια, που είναι δεσμευμένη στο σωληνάριο, αντανακλά τη συγκέντρωση του αντιγόνου. Η χρήση αρκετών διακριτών Mabs εμποδίζει την υπερειδικότητα.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Ποσότητα 96 προσδιορισμοί	Ποσότητα 4x96 προσδιορισμοί	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση
Σωληνάρια επιστρωμένα με αντί FSH (μονοκλωνικά αντισώματα)	2 x 48	8 x 48	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
Αντί-FSH (μονοκλωνικά αντισώματα) σημασμένα με ^{125}I σε ρυθμιστικό διάλυμα βορικών-PO ₄ με βόεια ορολευκωματίνη, αζύδιο (<0,1%) και αδρανής κόκκινη χρωστική	1 φιαλίδιο 5,5 ml 700 kBq	4 φιαλίδια 5,5 ml 4x700 kBq	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
Μηδενικός βαθμονομητής σε βόειο ορό με θυμόλη	1 φιαλίδιο λυοφιλ.	2 φιαλίδια λυοφιλ.	κίτρινο	Προσθέστε 2 ml απεσταγμένο υ νερού
Βαθμονομητές 1-6 σε βόειο ορό με θυμόλη (δείτε ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων)	6 φιαλίδια λυοφιλ.	12 φιαλίδια λυοφιλ.	κίτρινο	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένο υ νερού
Διάλυμα πλύσης (TRIS-HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	4 φιαλίδια 10 ml	καφέ	Αριθμήστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
Οροί ελέγχου 1 και 2 σε ανθρώπινο πλάσμα με θυμόλη	2 φιαλίδια λυοφιλ.	4 φιαλίδια λυοφιλ.	ασημί	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένο υ νερού

Σημείωση: 1. Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις ορών.

2. 1 mIU του βαθμονομητή είναι ισοδύναμο με 1 mIU του 1ou IS 92/510.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

- Απεσταγμένο νερό
- Πιτέτες για διανομή: 50 μl, 100 μl, 500 μl, 1 ml και 2 ml. (συνιστάται η χρήση πιτέτων ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη).
- Αναμείκτης στροβιλισμού
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Συσκευή ανάδευσης σωληναρίων
- Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
- Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό).
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε μετρητής γ ακτινοβολίας με δυνατότητα μέτρησης της ^{125}I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε το μηδενικό βαθμονομητή με 2 ml απεσταγμένο νερού και άλλους βαθμονομητές με 1 ml απεσταγμένο νερού.
- Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένο νερού.
- Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (70x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8°C.
- Μετά την ανασύσταση, οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου παραμένουν σταθεροί επί 3 ημέρες στους 2-8°C.
- Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, θα πρέπει να δημιουργηθούν κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης και να διατηρηθούν σε θερμοκρασία -20°C επί 3 μήνες το μέγιστο. Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμηνευτικό κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8°C.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Ο ορός και το πλάσμα πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιείται εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης στους -20°C.
- Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Ο ορός, το παρανισμένο πλάσμα ή το πλάσμα με EDTA παρέχουν παρόμοια αποτελέσματα.

$$Y \text{ (ορός)} = 1,00 x \text{ (ηπαρ. πλάσμα)} + 0,3 \quad r = 0,99 \quad n = 39$$

$$Y \text{ (ορός)} = 1,02x \text{ (πλάσμα με EDTA)} + 0,3 \quad r = 0,99 \quad n = 39$$

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**
Μή χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.
Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμολυνση.
Η ακριβεία βελτιώνεται με χρήση πιπέτων υψηλής ακριβείας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης.
Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε τον ημέρα της αναλύσεως.

B. Διαδικασία

- Σημάνετε επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα. Για τον προσδιορισμό των μετρήσεων του ιχνηθέτη ^{125}I ("total"), σημάνετε 2 κοινά (μη επιστρωμένα) σωληνάρια.
- Αναμείξτε για λίγο (με αναμείκτη στροβιλισμού τύπου vortex) βαθμονομητές, δείγματα και ορούς ελέγχου και διανέμετε 100 μl από έκαστο στα αντίστοιχα σωληνάρια.
- Διανείμετε 50 μl ιχνηθέτη αντί-FSH- ^{125}I σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβάνοντας τη μη επιστρωμένα σωληνάρια για τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total").
- Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώστε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
- Επωάστε επί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα σωληναρίων στις 700 rpm.
- Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total")). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.

7. Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ["total"]). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
8. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ["total"]).
9. Πλύνετε τα σωληνάρια και πάλι με 2 ml διαλύματος πλύσης (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ["total"]) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε).
10. Μετά την τελευταία πλύση, αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
11. Μετρήστε τα σωληνάρια σε μετρητή γ ακτινοβολίας για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1. Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
2. Σε ημιλογαριθμικό ή γραμμικό χαρτί γραφημάτων, παραστήστε γραφικά τις c.p.m. (κρούσεις ανά λεπτό) (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της FSH (τετμημένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
3. Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε ορό ελέγχου και δείγμα με αναγωγή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
4. Αναγωγή δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

FSH-IRMA		cpm	B/T (%)
Κρούσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total")		362200	100
Βαθμονομητής	0,0 mIU/ml 0,7 mIU/ml 3,5 mIU/ml 10,4 mIU/ml 30,0 mIU/ml 100,0 mIU/ml 152,0 mIU/ml	119 1265 2783 8400 28008 102364 160536	0,03 0,35 0,77 2,32 7,73 28,26 44,32

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- A. **Όριο ανίχνευσης**
Μετρήθηκαν είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 0,1 μIU/ml.
- B. **Ειδικότητα**
Ορμόνες διασταυρούμενης αντιδραστικότητας προστέθηκαν σε ένα βαθμονομητή χαμηλής και υψηλής τιμής FSH. Μετρήθηκε η φαινομενική απόκριση της FSH.

Προστεθείσα ορμόνη	FSH CAL 1		FSH CAL 5	
	mIU/ml	mIU/ml	mIU/ml	mIU/ml
-	0,65	100		
LH 300 mIU/ml	1,31	99,16		
hCG 300000 mIU/ml	1,46	100,31		
TSH 300 μIU/ml	0,98	98,31		

Γ. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ

Ορός	N	$\langle X \rangle \pm T.A.$ (mIU/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	$\langle X \rangle \pm T.A.$ (mIU/ml)	Σ.Δ. (%)
A	10	4,0 ± 0,1	1,8	A	20	15,0 ± 3,0	4,4
B	10	9,0 ± 0,2	2,0	B	20	41,9 ± 1,0	2,4
C	10	50,7 ± 0,5	1,1				

Δ. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Δείγμα	Προστεθείσα FSH (mIU/ml)	Ανακτηθείσα FSH (mIU/ml)	Ανάκτηση (%)
Ορός	6,4 25,1 88,8	6,2 23,6 86,1	97 94 97
Ηπαρινισμένο πλάσμα	6,4 25,1 88,8	7 25,1 96	109 100 108
Πλάσμα με EDTA	6,4 25,1 88,8	7,3 23,6 84,1	114 94 95

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (mIU/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (mIU/ml)
Ορός 1	1/1	-	8,6
	1/2	4,3	4,1
	1/4	2,2	2
	1/8	1,1	1,1
	1/16	0,5	0,5
Ορός 2	1/1	-	59,6
	1/2	29,8	31,3
	1/4	14,9	16,5
	1/8	7,5	8,2
	1/16	3,7	4,0
	1/32	1,9	2,0
	1/64	0,9	1,0

Τα δείγματα αραίωθηκαν με μηδενικό βαθμονομητή.

E. Μεσοδιάστημα

Οπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν αξιόπιστα ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 45 λεπτά μετά την προσθήκη του βαθμονομητή στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ

	0'	15'	30'	45'
Ορός 1 (mIU/ml)	1,9	1,7	1,8	1,7
Ορός 2 (mIU/ml)	4,2	4,3	4,2	4,2
Ορός 3 (mIU/ml)	9,6	9,5	9,3	9,3
Ορός 4 (mIU/ml)	52,0	52,0	52,0	53,0

ΣΤ. Φαινόμενο αγκίστρου (hook)

Δείγμα που εμβολιάστηκε με FSH έως 1000 μIU/ml δίνει υψηλότερες μετρήσεις από το σημείο του τελευταίου βαθμονομητή.

XIV. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Δείγματα από ασθενείς που έχουν λάβει παρασκευάσματα μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού για σκοπούς διάγνωσης ή θεραπείας, ενδεχομένως να περιέχουν ανθρώπινα αντισώματα αντί ποντικού (HAMA). Σε αυτά τα δείγματα μπορούν να παρατηρηθούν ψευδώς αυξημένες ή ψευδώς μειωμένες τιμές, όταν ελέγχονται με κιτ προσδιορισμού που χρησιμοποιούν μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού.
- Τα επεροφυλικά αντισώματα στον ανθρώπινο ορό μπορούν να αντιδράσουν με ανοσοσφαίρινες των αντιδραστηρίων, προκαλώντας παρεμβολή σε *in vitro* ανοσοπροσδιορισμούς.

Ασθενείς που εκτίθενται τακτικά σε ζώα ή προϊόντα ζωικού ορού ενδεχομένους να είναι επιφρεπείς σε αυτήν την παρεμβολή. Παθολογικές τιμές μπορούν να παρατηρηθούν σε παρουσία ετεροφιλικών αντισωμάτων. Αξιολογείτε με προσοχή τα αποτελέσματα ασθενών, στους οποίους υπάρχει υποψία αυτών των αντισωμάτων.

Εάν τα αποτελέσματα δεν είναι σύμφωνα με άλλες κλινικές παρατηρήσεις, θα χρειαστεί η λήψη περαιτέρω πληροφοριών πριν από τη θέση της διάγνωσης.

XV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

XVI. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές παρέχονται πιο κάτω μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.

Το πεδίο τιμών εκφράζεται ως ποσοστά επί τοις εκατό 2,5% έως 97,5%.

Ταυτοποίηση	Αριθμός ατόμων	Μέση τιμή (mIU/ml)	Πεδίο τιμών (mIU/ml)
Παιδιά (0 έως 12 ετών)			
▪ Αγόρια	20	0,9	0,1 - 2,3
▪ Κορίτσια	20	2,7	0,4 - 12,7
Έφηβοι (12 έως 18 ετών)			
	18	4,5	0,3 - 9,0
Αρρενες ενήλικοι			
	69	4,2	1,3 - 8,1
Γυναίκες			
▪ Κύκλοι ωορρηξίας			
- Ωοθηλακτική φάση (ημέρα -12 έως -6)	34	6,1	1,8 - 9,4
- Κορυφή ωορρηξίας (ημέρα 0)	48	11,9	3,4 - 33,1
- Ωχρινική φάση (ημέρα +6 έως +12)	63	4,3	1,2 - 13,4
▪ Μετεμπηνοπαυσιακές	53	64,7	27,7 - 93,3

XVII. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφαλείας

Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

Το κιτ αυτό περιέχει το ^{125}I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονιζόντα ακτινοβολία X (28 keV) και γ (35.5 keV).

Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.

Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γνάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοιστόπων.

Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα διατενεργή απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο κιτ αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγρή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αξιό διο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αξιό διο στο κιτ αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αξιόδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσώρευσης αξιόδιου.

Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης.

XVIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. CLARKE J.J., CUMMINS J.T. (1987) **Pulsatility of reproductive hormones: physiological basis and clinical implications.** Baillière's Clin. Endocrinol. Metab., 1:1
2. FILICORI M., SANTORO N., MERRIAN G.R., CROWLEY W.F. Jr., (1986) **Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 62:1136
3. MAIS V., CETEL N.S., MUSE K.N., QUIGLEY M.E., REID R.L., YEN S.S.C. (1987) **Hormonal dynamics during luteal-follicular transition.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 64:1109
4. SAWYER-STEFFAN J.E., LASLEY B.L., HOFF J.D., YEN S.S.C. (1982) **Comparison of in-vitro bioactivity and immunoreactivity of serum LH in normal cyclic and hypogonadal women treated with low doses of LH-RH.** J. Reprod. Fertil., 65:45
5. THOMAS C.M.G., SEGERS M.F.G. (1988) **Measurement of Serum hLH: hCG interference evaluated for two hLH-Specific IRMA kits.** Clin. Chem., 34:768
6. LOUMAYE E., VANKRIEKEN L., DEPREESTER S., PSALTI I., de COOMAN S., THOMAS K. (1989) **Hormonal changes induced by short-term administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and their consequences for embryo development.** Fertil. and Steril., 51:105
7. VERMES I., BONTE H.A., SLUIS VEER G., SCHOE MAKER J. (1991) **Interpretations of five monoclonal immunoassays of Lutropin and Follitropin: effects of normalization with WHO standard.** Clin. Chem., 37:415
8. DEMOULIN A., DUBOIS M., GERDAY C., GILLAIN D., LAMBOTTE R., FRANCHIMONT P. (1991) **Variation of luteinizing hormone serum concentration after exogenous human chorionic gonadotropin administration during ovarian stimulation.** Fertil. and Steril., 55:796
9. MASSA G., de ZECHER F., VANDERSCHUREN-LODEWYK K. (1992) **Serum levels of immunoreactive Inhibine, FSH and LH in human infants at Preterm and Term Birth.** Biol. of the Neonat., 61:150
10. DE HERTOGH R., VANKRIEKEN L., THOMAS K. de GASPARO M. (1992) **Circhoral fluctuations of serum total renin, inhibin and related hormones around the mid-cycle in normal human females.** Hum. Reprod., 7:337

XIX. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΚΡΟΥΣΕΙΣ "TOTAL" ml	ΒΑΘΜΟΝΟΜΗ- ΤΕΣ ml	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ml
Βαθμονομητές (0-6) Δείγματα, οροί ελέγχου Ιχνηθέτης	- 0,05	0,1 0,05	- 0,1 0,05
Επώαση	1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση στις 700 rpm		
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης Διαχωρισμός	- - - -	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2,0 Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2,0 Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)	
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα		

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

FSH-IRMA

I. PRZEZNACZENIE

Oznaczenie immunoradiometryczne do ilościowego pomiaru ludzkiego hormonu folikulostymulującego (Follicle Stimulating Hormone (FSH)) w surowicy i osoczu metodą *in vitro*.

II. INFORMACJE OGÓLNE

A. Nazwa firmowa: DIAsource FSH-IRMA Kit

B. Numer katalogowy: KIP0841: 96 oznaczeń

C. Wyprodukowano przez: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgia.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:
Tel: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACJE KLINICZNE

Pomiar stężeń LH i FSH w surowicy jest podstawowym badaniem w diagnostyce niepłodności a zwłaszcza zaburzeń osi podwzgórzowo/przysadkowo/gonadalnej.

Zarówno LH, jak i FSH są wydzielane przez komórki zasadochłonne przysadki, w wyniku sekrecji hormonu gonadoliberyny (GnRH) w podwzgórzu.

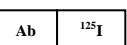
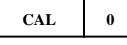
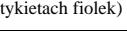
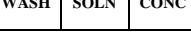
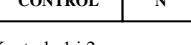
U dorosłych, hormony LH i FSH kontrolują funkcje gonad, a zwłaszcza gametogenezę i wydzielanie sterydów. Poziomy FSH we krwi kążącej są kontrolowane przez ujemne sprzężenie zwrotne działające na podwzgórzu, poprzez hormony sterydowe i peptydy gonadalne.

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

Oznaczenie DIAsource FSH-IRMA jest metodą immunoradiometryczną, opartą na separacji w opłaszczonej probówce. Mabs 1 – przeciwciała przechwytyjące – są umocowane do dolnej i wewnętrznej powierzchni plastikowej probówki. Kalibratory lub próbki, dodawane do probówek, będą na początku wykazywały niskie powinowactwo do Mabs1. Dodanie Mab2, przeciwcała sygnałowego oznakowanego ^{125}I zakończy etap i wyzwoli reakcję immunologiczną. Po przepukaniu, stopień radioaktywności związanej z probówką odzwierciedla stężenie antygenu.

Wykorzystywanie różnych Mabs pozwala na uniknięcie nadmiernej czułości.

V. DOSTARCZONE ODCZYNNIKI

Odczynniki	Ilość 96 oznaczeń	Ilość 4 x 96 oznaczeń	Kolor	Rekonstytucja
 Probówki opłaszczone przeciwcałami anty-FSH (przeciwciała monoklonalne)	2 x 48	8 x 48	czerwony	Gotowe do zastosowania
 Przeciwciała (monoklonalne) anty-FSH oznakowane Jodem ^{125}I w buforze borowo-fosforanowym zawierającym bydlęcą albuminę surowiczą, azydek (0,1%) i czerwony barwnik	1 fiołka 5,5 ml 700 kBq	4 fiołek 5,5 ml 4 x 700 kBq	czerwony	Gotowe do zastosowania
 Kalibratory 0 w surowicy bydlęcej z tymolem.	1 fiołka liofil.	2 fiołek liofil.	żółty	Dodać 2 ml wody destylowanej
 Kalibratory 1 - 6 w surowicy bydlęcej z tymolem (dokładne wartości na etykietach fiolek)	6 fiołek liofil.	12 fiołek liofil.	żółty	Dodać 1 ml wody destylowanej
 Roztwór pluczający (TRIS-HCl)	1 fiołka 10 ml	4 fiołek 10 ml	brązowy	Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).
 Kontrola 1 i 2 w osocza pochodzenia ludzkiego z tymolem	2 fiołek liofil.	4 fiołek liofil.	srebrny	Dodać 0,5 ml wody destylowanej

Uwaga: 1. Do rozcieńczania próbek należy użyć kalibratora zerowego.
2. 1 mIU kalibratora jest równoważne 1 mIU z 1st IS 92/510.

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

Poniższe materiały są wymagane, ale nie są dostarczone w zestawie:

- Woda destylowana
- Pipety do dostarczania objętości: 50 µl, 100 µl, 500 µl, 1 ml i 2 ml. (zaleca się stosowanie właściwych pipet z jednorazowymi końcówkami plastycznymi)
- Mieszadło wirowe
- Mieszadło magnetyczne
- Wytrząsarka probówek
- Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania
- Układ do aspiracji (opcjonalnie)
- Mожет быть использованы любые гамма-изотопные счетчики, соответствующие измерению ^{125}I (минимальный выход 70%).

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- Kalibratory:** Rekonstytuować kalibrator 0 przy pomocy 2 ml wody destylowanej a inne kalibratory przy pomocy 1 ml.
- Kontrole:** Kontrole należy rekonstytuować przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.
- Roboczy roztwór pluczający:** Właściwą objętość roboczego roztworu pluczającego należy przygotować dodając 69 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu pluczającego (70x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszadło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór pluczający należy wyłączyć pod koniec dnia.

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstytucją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykiecie, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Po rozpuszczeniu, kalibratory i kontrole zachowują stabilność przez 3 dni w temperaturze 2-8°C.
- W razie konieczności dłuższego przechowywania, niewielkie objętości powinny być przechowywane w temperaturze -20°C przez maksymalnie 3 miesiące. Unikać cykli rozmrzania i zamrażania.
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór pluczający powinien być wykorzystany w tym samym dniu.
- Po jego pierwszym zastosowaniu, znaczniček izotopowy zachowuje trwałość do podanej daty ważności jeżeli jest przechowywany w oryginalnej, dobrze zamkniętej fiołce w temperaturze od 2 do 8°C.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Surowica i osocze muszą być przechowywane w temperaturze 2-8°C.
- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 24 godzin, zaleca się przechowywanie w niewielkich ilościach w temperaturze -20°C.
- Unikać powtarzanych cykli zamrażania i rozmrzania.
- Surowica i osocze heparynizowane, bądź zawierające EDTA, pozwalają na uzyskanie podobnych wyników.

$$Y(\text{surowica}) = 1,00 \times (\text{osocze hep.}) + 0,3 \quad r = 0,99 \quad n = 39$$

$$Y(\text{surowica}) = 1,02 \times (\text{osocze z EDTA}) + 0,3 \quad r = 0,99 \quad n = 39$$

X. PROCEDURA

A. Uwagi dotyczące obsługi

Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upłynięciu daty ważności. Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów. Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową.

Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie. Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste, jednorazowe końcówki pipet.

Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia. Przestrzegać czasów inkubacji.

Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.

Procedura

- Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli należy oznaczyć opłaszczone probówki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 zwykłe probówki.
- Szybko wymieszać wirując: kalibratory, próbki i kontrole, i dozować po 100 µl każdej substancji do odpowiednich probówek.
- Dodać 50 µl anty-FSH- ^{125}I (znaczniček izotopowy) do wszystkich probówek w tym do nieopłaszczonych probówek do całkowitego zliczania.
- Delikatnie potrząsać (ręcznie) stojak z probówkami, aby uwolnić wszelkie, uwieńzione pęcherzyki powietrza.
- Inkubować przez 60 minut w temperaturze pokojowej na mieszałce wirowej (700 obrótów/min).
- Aspirować (lub odrąć) zawartość każdej probówki (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania). Aby usunąć cały płyn należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej probówki.
- Przepływać probówki przy pomocy 2 ml roboczego roztworu pluczającego (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania). W trakcie dodawania roboczego roztworu pluczającego należy unikać wytwarzania piany.
- Aspirować (lub odrąć) zawartość każdej probówki (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania).

9. Ponownie przepłukać probówki przy pomocy 2 ml roztworu płuczącego (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania) i aspirować (lub odlać).
10. Po ostatnim płukaniu, pozostawić probówkę w pozycji stojącej do góry na dwie minuty i aspirować pozostałe krople płynu.
11. Zliczać probówki w liczniku gamma przez 60 sekund.

XI. OBLCZANIE WYNIKÓW

1. Obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
2. Na papierze milimetrowym lub w kratkę wykreślić c.p.m. (rzędna) dla każdego kalibratora wobec odpowiadającego stężenia FSH (odcięta) oraz wykreślić krzywą kalibracji przez punkty kalibratora, odrzucając oczywiste wartości odbiegające od linii środkowej.
3. Odczytać stężenie dla każdej kontroli i próbki przez naniesienie na krzywą kalibracyjną.
4. Redukcja danych przy pomocy komputera pozwoli uprościć te obliczenia. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

Poniższe dane są przedstawione wyłącznie w celach przykładowych i nie powinny być nigdy stosowane zamiast rzeczywistych krzywych kalibracyjnych.

FSH-IRMA	cpm	B/T (%)
Zliczanie całkowite	362200	100
Kalibrator		
0,0 mIU/ml	119	0,03
0,7 mIU/ml	1265	0,35
3,5 mIU/ml	2783	0,77
10,4 mIU/ml	8400	2,32
30,0 mIU/ml	28008	7,73
100,0 mIU/ml	102364	28,26
152,0 mIU/ml	160536	44,32

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Granica wykrywania

Dwadzieścia kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów. Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmienne stężenie dwóch odchyлеń standardowych powyżej przeciętnej wartości zliczania przy wiązaniu zerowym kształtała się na poziomie 0,1 mIU/ml.

B. Swoistość

Hormony reagujące krzyżowo były dodane do kalibratora niskich i wysokich poziomów FSH. Oznaczano przybliżoną odpowiedź FSH.

Dodany hormon	FSH CAL 1 mIU/ml	FSH CAL 5 mIU/ml
-	0,65	100
LH 300 mIU/ml	1,31	99,16
hCG 300000 mIU/ml	1,46	100,31
TSH 300 µIU/ml	0,98	98,31

C. Precyzja

W SERII				POMIĘDZY SERIAMI			
Surowica	N	X ± S.D. (mIU/ml)	CV %	Surowica	N	X ± S.D. (mIU/ml)	CV %
A	10	4,0 ± 0,1	1,8	A	20	15,0 ± 3,0	4,4
B	10	9,0 ± 0,2	2,0	B	20	41,9 ± 1,0	2,4
C	10	50,7 ± 0,5	1,1				

SD Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

D. Dokładność

BADANIE ODZYSKU

Próbka	FSH dodana (mIU/ml)	FSH odzyskany (mIU/ml)	Odzysk (%)
Surowica	6,4	6,2	97

	25,1 88,8	23,6 86,1	94 97
Osocze z heparyną	6,4 25,1 88,8	7 25,1 96	109 100 108
Osocze z EDTA	6,4 25,1 88,8	7,3 23,6 84,1	114 94 95

BADANIE ROZCIEŃCZENIA

Próbka	Rozcieńczenie	Stęž. teoretyczne (mIU/ml)	Stęž. zmierzona (mIU/ml)
Surowica 1	1/1	-	8,6
	1/2	4,3	4,1
	1/4	2,2	2
	1/8	1,1	1,1
	1/16	0,5	0,5
Surowica 2	1/1	-	59,6
	1/2	29,8	31,3
	1/4	14,9	16,5
	1/8	7,5	8,2
	1/16	3,7	4,0
	1/32	1,9	2,0
	1/64	0,9	1,0

Próbki zostały rozcieńczone przy pomocy kalibrator zerowy

E. Opóźnienie pomiędzy oznaczeniem ostatniego kalibratora i dozowaniem próbki

Jak wykazano, wyniki pomiaru pozostają dokładne nawet wówczas, gdy od momentu dodania kalibratora do opłaszczonych próbówek minęło 45 minut.

OPÓŹNIENIE

	0'	15'	30'	45'
Surowica 1 (mIU/ml)	1,9	1,7	1,8	1,7
Surowica 2 (mIU/ml)	4,2	4,3	4,2	4,2
Surowica 3 (mIU/ml)	9,6	9,5	9,3	9,3
Surowica 4 (mIU/ml)	52,0	52,0	52,0	53,0

F. Efekt hook'a

Próbka nasyciona FSH o stężeniu do 1000 mIU/ml daje wyższe wartości zliczeń niż ostatni punkt kalibracyjny.

XIV. OGRANICZENIA

- Próbki od pacjentów, którzy w celach diagnostycznych lub terapeutycznych otrzymywali preparaty z mysich przeciwciał monoklonalnych, mogą zawierać ludzkie przeciwciała anty-mysie (HAMA). Próbki takie, oznaczone z użyciem zestawów testowych wykorzystujących mysie przeciwciało monoklonalne, mogą wykazywać wartości fałszywie zawyżone lub zanizowane.
- Przeciwciało heterofilne w ludzkiej surowicy mogą reagować z immunoglobulinami odczynnika, interferując z oznaczeniami immunologicznymi przeprowadzanymi in vitro. Pacjenci rutynowo eksponowani na zwierzęta lub produkty z surowic zwierzęcych mogą wykazywać skłonność do takich interferencji i w razie obecności przeciwciał heterofilnych występować mogą u nich nieprawidłowe wyniki testów. Wyniki oznaczeń próbek od pacjentów z takimi przeciwciałami należy interpretować z ostrożnością. Jeżeli wyniki nie są zgodne z obserwacjami klinicznymi, przed postawieniem rozpoznania powinny być uzyskane dodatkowe informacje.

XV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli wyniki uzyskane dla kontroli 1 i/lub 2 nie znajdują się w zakresie określonym na etykietce fiolki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane dopóki nie uda się znaleźć właściwego wyjaśnienia tego odchylenia.
- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach. Nie wolno zamrażać i rozmrzać więcej niż dwukrotnie.
- Dopuszczalne kryteria dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium.

XVI. ZAKRESY REFERENCYJNE

Wartości przedstawione poniżej mają wyłącznie cel orientacyjny; każde laboratorium powinno opracować własne zakresy norm.
Zakres jest wyrażony jako 2,5 – 97,5 percentyla.

Identyfikacja	Liczba osobników	Średnia (mIU/ml)	Zakres (mIU/ml)
Dzieci (0 – 12 lat)			
▪ Chłopcy	20	0,9	0,1 – 2,3
▪ Dziewczęta	20	2,7	0,4 – 12,7
Okres dojrzewania (12 – 18 lat)	18	4,5	0,3 – 9,0
Dorośli mężczyźni	69	4,2	1,3 – 8,1
Kobiety			
▪ Cykle jajnikowe			
- Faza folikularna (od -12 do -6 dnia)	34	6,1	1,8 – 9,4
- Szczyt owulacyjny (dzień 0)	48	11,9	3,4 – 33,1
- Faza lutearna (od +6 do +12 dnia)	63	4,3	1,2 – 13,4
▪ Okres pomenopauzalny	53	64,7	27,7 – 93,3

XVII. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Bezpieczeństwo

Tylko do diagnostyki *in vitro*.

Zestaw zawiera ^{125}I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emittujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35,5 keV).

Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.

Obsługa materiałów radioaktywnych powinno być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsce ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wyposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone substancjami radioaktywnymi powinno być oddzielone w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów.

Wszelkie plamy z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczone zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie.

Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwiał anty-HCV, anty-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności że materiały pochodzenia ludzkiego nie przenoszą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego postępowanie z odczynnikami i próbami surowicy lub osocza powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydlęce pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.

Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierają azydek sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią i ołowiem w układzie kanalizacyjnym tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków.

Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów, bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

XVIII. BIBLIOGRAFIA

- CLARKE J.J., CUMMINS J.T. (1987)
Pulsatility of reproductive hormones: physiological basis and clinical implications.
Baillière's Clin. Endocrinol. Metab., 1:1
- FILICORI M., SANTORO N., MERRIAN G.R., CROWLEY W.F. Jr., (1986)
Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 62:1136

- MAIS V., CETEL N.S., MUSE K.N., QUIGLEY M.E., REID R.L., YEN S.S.C. (1987)
Hormonal dynamics during luteal-follicular transition.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 64:1109
- SAWYER-STEFFAN J.E., LASLEY B.L., HOFF J.D., YEN S.S.C. (1982)
Comparison of in-vitro bioactivity and immunoreactivity of serum LH in normal cyclic and hypogonadal women treated with low doses of LH-RH.
J. Reprod. Fertil., 65:45
- THOMAS C.M.G., SEGERS M.F.G. (1988)
Measurement of Serum hLH: hCG interference evaluated for two hLH-Specific IRMA kits.
Clin. Chem., 34:768
- LOUMAYE E., VANKRIEKEN L., DEPREESTER S., PSALTI I., de COOMAN S., THOMAS K. (1989)
Hormonal changes induced by short-term administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and their consequences for embryo development.
Fertil. and Steril., 51:105
- VERMES I., BONTE H.A., SLUIS VEER G., SCHOEMAKER J. (1991)
Interpretations of five monoclonal immunoassays of Lutropin and Follitropin: effects of normalization with WHO standard.
Clin. Chem., 37:415
- DEMOULIN A., DUBOIS M., GERDAY C., GILLAIN D., LAMBOTTE R., FRANCHIMONT P. (1991)
Variation of luteinizing hormone serum concentration after exogenous human chorionic gonadotropin administration during ovarian stimulation.
Fertil. and Steril., 55:796
- MASSA G., de ZECHER F., VANDERSCHUREN-LODEWKY K. (1992)
Serum levels of immunoreactive Inhibine, FSH and LH in human infants at Preterm and Term Birth.
Biol. of the Neonat., 61:150
- DE HERTOGH R., VANKRIEKEN L., THOMAS K. de GASPARO M. (1992)
Circhoral fluctuations of serum total renin, inhibin and related hormones around the mid-cycle in normal human females.
Hum. Reprod., 7:337

XIX. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

	CAŁKOWITA LICZBA ZLICZEŃ ml	KALIBRATORY ml	PRÓBKA(I) KONTROLE ml
Kalibratory (0-6) Próbki, kontrole Znacznik izotopowy	- - 0,05	0,1 - 0,05	- 0,1 0,05
Inkubacja	60 minut w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem 700 rpm		
Rozdzielenie Roztwór płuczący Rozdzielenie Roztwór płuczący Rozdzielenie	- - - - -	aspiracja (lub odlewanie) 2,0 aspiracja (lub odlewanie) 2,0 aspiracja (lub odlewanie)	
Zliczanie	Zliczanie próbówek przez 60 sekund		



bu

Прочетете целия протокол преди употреба

FSH-IRMA

I. УПОТРЕБА

Имуорадиометричен набор за количествени измервания *in vitro* на човешки фоликулостимулиращ хормон (FSH) в серум и плазма.

II. ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

A. Патентовано име: DIAsource FSH-IRMA Kit

B. Каталожен номер: KIP0841: 96 теста

C. Произведено от: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

За техническа помощ или поръчка:
Тел.: +32 (0)10 84.99.11 Факс: +32 (0)10 84.99.91

III. КЛИНИЧЕН ПРЕГЛЕД

Измерването на концентрациите на LH и FSH в серума е от есенциално значение за изследване на фертилитета и особено на нарушенията на хипоталамо-хипофизарно-гонадната ос.

Както LH, така и FSH се секретират от базофилните клетки в предния дял на хипофизата в резултат на секрецията на гонадотропин-освобождаващ хормон (GnRH) от клетките на хипоталамуса.

При възрастни индивиди хормоните LH и FSH контролират гонадната функция, основно гаметогенезата и стероидната секреция.

Нивата на FSH в кръвообращението се контролират чрез отрицателна обратна връзка с хипоталамуса посредством стероидните хормони и гонадните пептиди.

IV. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА

DIAsource FSH-IRMA е имунорадиометрично изследване на база на сепарация на покрити епруветки. Mabs1 (моноклонални антитела 1), които са прихващащи антитела, са разположени по долната и вътрешната повърхност на пластмасовата епруветка. Калибраторите или пробите, които се добавят към епруветките отначало показват слаб афинитет към Mabs1. Добавянето на Mabs2, които са сигнални антитела, маркирани с ^{125}I , завършват системата и пускат в ход имунологичната реакция. След измиване остатъчната радиоактивност, свързана с епруветката, отразява антигенната концентрация. Използването на няколко различни Mabs предотвратява развитието на хиперспецифичност.

V. ИЗПОЛЗВАНИ РЕАГЕНТИ

Реагенти	Количество 96 теста	Количество 4 x 96 теста	Цветен код	Приготвяне
Епруветки, покрити с анти- FSH (моноклонални антитела)	2 x 48	8 x 48	червен	Готов за употреба
Ab 125I Анти-FSH- ^{125}I (моноклонални антитела) в боратен – PO ₄ буфер със волски серумен албумин, натриев азид (<0.1%) и инертна червена боя	1 флакон 5.5 ml 700 kBq	4 флакона 5.5 ml 4 x 700 kBq	червен	Готов за употреба
CAL 0 Нулев Калибратор във волски serum с тимол	1 флакон лиофилизиран	2 флакона лиофилизиран	жълт	Добавете 2 ml дестилирана вода
CAL N Калибратори 1-6 във волски serum с тимол (виж точните стойности на етикетите на флаконите)	6 флакона лиофилизиран	12 флакона лиофилизиран	жълт	Добавете 1 ml дестилирана вода
WASH SOLN CONC Измиващ разтвор (TRIS-HCl)	1 флакон 10 ml	4 флакона 10 ml	кафяв	Разредете 70x с дестилирана вода (използвайте магнитен сепаратор)
CONTROL N Контроли 1 и 2 в човешка плазма с тимол	2 флакона лиофилизиран	4 флакона лиофилизиран	сребърен	Добавете 0.5 ml дестилирана вода

Забележка: 1. Използвайте нулевия калибратор за серумните разреждания.
2. 1 mIU от калибирирания препарат е еквивалентен на 1 mIU от 1st IS 92/510.

VI. СРЕДСТВА, КОИТО НЕ СЕ ОСИГУРЯВАТ

Следните материали са необходими, но не се осигуряват в набора:

- Дестилирана вода
- Пипети от: 50 µl, 100 µl, 500 µl, 1 ml и 2 ml (препоръчва се използването на прецизни пипети с накрайници за еднократна употреба).
- Завихрящ смесител
- Магнитен сепаратор
- Клатещо устройство за епруветки
- 5 ml автоматична спринцовка (тип Cornwall) за измиване
- Аспирационна система (по избор).
- Всякакъв гама брояч, който може да измери употребеното количество ^{125}I (минимален капацитет от 70%).

VII. ПРИГОТВЯНИЕ НА РЕАГЕНТА

- Калибратори:** Реконституирайте нулевия калибратор с 2 ml дестилирана вода, а другия калибратор – с 1 ml дестилирана вода.
- Контроли:** Реконституирайте контролите с 0.5 ml дестилирана вода.
- Работен измиващ разтвор:** Подгответе адекватен обем от работния измиващ разтвор чрез добавянето на 69 обема дестилирана вода към 1 обем от измивания разтвор (70x). Използвайте магнитен сепаратор, за да хомогенизирате. Изхвърлете неупотребеното количество от работния измиващ разтвор в края на дена.

VIII. СЪХРАНЕНИЕ И СРОК НА ГОДНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

- Всички компоненти на кита са стабилни до датата на срока на годност, посочен на опаковката, при температура на съхранение от 2 °C до 8°C преди отваряне или реконституиране.
- След реконституиране, калибраторите и контролите са стабилни за срок от 3 дни при температура 2-8°C. За по-дълги срокове на съхранение, се определя кратко и се съхранява при температура -20 °C за максимум 3 месеца. Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.
- Пряко приготвения Работен измиващ разтвор трябва да бъде използван същия ден.
- След първата употреба, трейсера е стабилен до изтичане срока на годност, ако се съхранява в оригиналния добре затворен флакон при температури 2-8°C.
- Промени във физическия вид на реагентите на кита индицират нестабилност или негодност.

IX. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИТЕ И ОБРАБОТКА

- Серумът и плазмата трябва да се съхраняват при температури 2 – 8°C.
- Ако тестът не се направи в рамките на 24 часа, се препоръчва съхранение при температура -20°C.
- Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.
- Серумът, хепаринизираната плазма или плазмата с EDTA показват подобни резултати.

$$Y(\text{серум}) = 1,00x \text{ (хепаринизирана плазма)} + 0,3 \quad r = 0,99 \quad n = 39$$

$$Y(\text{серум}) = 1,02x \text{ (плазма с EDTA)} + 0,3 \quad r = 0,99 \quad n = 39$$

X. ПРОЦЕДУРА

A. Общи бележки

Не използвайте кита или компонентите му след датата на изтичане срока на годност. Не смесвайте материали от различни партиди китове. Преди употреба оставете всички реагенти на стайна температура. Внимателно смесвайте всички реагенти с пробите чрез нежно раклащане или въртеливо разместване. За да избегнете кръстосана контаминация, използвайте чист пипетен накрайник за еднократна употреба за добавянето на всеки реагент към съответната проба. Високо прецизираните пипети или автоматичните пипети биха подобрели точността. Съобразявайте се с времето за инкубация. Подгответе калибрационна крива за всяко измерване и не използвайте данни от предишни измервания.

B. Процедура

- Означете две по две покритите епруветки за всеки калибратор, контрола и проба. За определяне на общия брой импулси, обозначете 2 нормални епруветки.
- Разплатете за кратко време калибраторите, контролите и пробите и разпределете по 100 µl от всяко в съответните епруветки.
- Разпределете 50 µl от анти-FSH- ^{125}I трейсер във всяка епруветка, включително и в епруветките без покритие за общия брой импулси.
- Разтворете нежно с ръка стойката с епруветките, за да освободите някое остатъчно въздушно мехурче.
- Инкубирайте за 1 час при стайна температура в клатещо устройство за епруветки (700 оборота в минута).
- Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че пластмасовият край на аспиратора достига дъното на покритата епруветка, за да може да отстрани цялата течност.
- Изплакнете епруветките с 2 ml от Измивания разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Избягвайте

получаването на пяна по време на добавянето на Работния измиващ разтвор.

8. Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси).
9. Изплакнете отново епруветките с 2 ml от Измивация разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси) и аспирирайте (или прелейте).
10. След последното изплакване, оставете епруветките да стоят обрнати нагоре за две минути и аспирирайте останалите капчици от течността.
11. Отчетете епруветките в гама брояч за 60 секунди.

XI. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

1. Изчислете средното аритметично на резултатите, получени от две по две епруветки.
2. На полулогаритмична или линейна диаграма върху графична хартия нанесете (на ординатата) броят на минута за всеки калибратор (общ брой импулси в минута) спрямо (на абсцисата) съответната концентрация на FSH и начертайте калибрационна крива през калибрационните точки като не включвате точките, които очевидно не принадлежат към тази крива.
3. Прочетете концентрациите за всяка контрола и проба чрез интерполиране върху калибрационната крива.
4. Тези изчисления могат да се улеснят чрез асистирано редуциране на данните посредством компютър. Ако се използва автоматична обработка на резултатите, се препоръча прилагането на 4-параметрова логистична функционална крива.

XII. ХАРАКТЕРНИ ДАННИ

Данните, изложени по-долу са само за илюстрация и никога не бива да се използват вместо истинската калибрационна крива.

FSH-IRMA		сpm	B/T (%)
Общ брой		362200	100
Калибратор	0,0 mIU/ml	207	0,03
	0,7 mIU/ml	533	0,35
	3,5 mIU/ml	1165	0,77
	10,4 mIU/ml	3821	2,32
	30,0 mIU/ml	12920	7,73
	100,0 mIU/ml	50053	28,26
	152,0 mIU/ml	93732	44,32

XIII. ИЗПЪЛНЕНИЕ И ОГРАНИЧЕНИЯ

A. Определен лимит

Двадесет нулеви калибратора са били изпитани заедно с комплект от други калибратори. Определения лимит, дефиниран като явната концентрация на две стандартни отклонения над средния брой при нулево свързване, е бил 0,1 mIU/ml.

B. Специфичност

Хормони с кръстосана реактивност са добавени към калибратор за ниски и високи стойности на FSH. Явният FSH отговор е измерен.

добавен хормон	FSH CAL 1 mIU/ml	FSH CAL 5 mIU/ml
-	0,65	100
LH 300 mIU/ml	1,31	99,16
hCG 300000 mIU/ml	1,46	100,31
TSH 300 µIU/ml	0,98	98,31

C. Прецизност

ПО ВРЕМЕ НА ИЗПИТВАНЕТО МЕЖДУ ИЗПИТВАНЕТО

Серум	N	$\bar{X} \pm S.D.$ mIU/ml	CV (%)	Серум	N	$\bar{X} \pm S.D.$ mIU/ml	CV (%)
A	10	4,0 ± 0,1	1,8	A	20	15,0 ± 3,0	4,4
B	10	9,0 ± 0,2	2,0	B	20	41,9 ± 1,0	2,4
C	10	50,7 ± 0,5	1,1				

D. Точност

ВЪЗСТАНОВИТЕЛЕН ТЕСТ

Проба	Добавен FSH (mIU/ml)	Възстановен FSH (mIU/ml)	Възстановяване (%)
Серум	6,4	6,2	97
	25,1	23,6	94
	88,8	86,1	97
Хепаринизирана плазма	6,4	7	109
	25,1	25,1	100
	88,8	96	108
Плазма с EDTA	6,4	7,3	114
	25,1	23,6	94
	88,8	84,1	95

ТЕСТ С РАЗРЕЖДАНЕ

Проба	Разреждане	Теоретична концентрация (mIU/ml)	Измерена концентрация (mIU/ml)
Серум 1	1/1	-	8,6
	1/2	4,3	4,1
	1/4	2,2	2
	1/8	1,1	1,1
	1/16	0,5	0,5
Серум 2	1/1	-	59,6
	1/2	29,8	31,3
	1/4	14,9	16,5
	1/8	7,5	8,2
	1/16	3,7	4,0
	1/32	1,9	2,0
	1/64	0,9	1,0

Пробите са били разредени с нулев калибратор.

E. Закъснение

Както е показано по-долу, резултатите от изпитването остават точни дори когато пробата е разпределена 45 минути след като калибраторът е бил добавен към покритата епруветка.

	0'	15'	30'	45'
Серум 1 (mIU/ml)	1,9	1,7	1,8	1,7
Серум 2 (mIU/ml)	4,2	4,3	4,2	4,2
Серум 3 (mIU/ml)	9,6	9,5	9,3	9,3
Серум 4 (mIU/ml)	52,0	52,0	52,0	53,0

F. Ефект на кукичката

Пробите, съдържащи до 1000 mIU/ml FSH, дават по-високи резултати спрямо последната точка на калибриране.

XIV. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Проби от пациенти, които са приели препарати от миши моноклонални антитела за диагностика или лечение, могат да съдържат човешки анти-миши антитела (HAMA). Тези проби могат да покажат или фалшиво повишени, или намалени стойности, когато се тестват с китове, които използват миши моноклонални антитела.
- Хетерофилените антитела в човешкия серум могат да реагират с реагентните имуноглобулини, смущавайки ин витро имунотестовете. Пациенти, рутинно изложени на животни или на продукти от животински серум, могат да бъдат предразположени към тези смущения и могат да се наблюдават аномални стойности в случай на наличие на хетерофиленни антитела. Внимателно преценявайте резултатите на пациенти, за които има подозрения, че имат от тези антитела.

Ако резултатите не са съвместими с други клинични наблюдения, ще се изиска допълнителна информация преди поставяне на диагноза.

XV. ВЪТРЕШЕН КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

- Ако резултатите, получени за Контрола 1 и/или Контрола 2 не са в рамките на нивото, указано на етикета на флакона, то резултатите не могат да бъдат използвани, освен ако не се предостави задоволително обяснение на това несъответствие.
- По желание, всяка лаборатория може да си направи собствен комплект от контролни преби, които трябва да се съхраняват замразени в кратни съотношения.

- Критериите за приемане на разликата от двойните резултати на пробите трябва да се опират на Добрата Лабораторна Практика.

XVI. РЕФЕРЕНТИНТИ ИНТЕРВАЛИ

Стойностите, показани по-долу, са предоставени само за напътствие; всяка лаборатория трябва да установи свои собствен нормален обхват на стойности.

Идентификация	Брой обекти	Средно (mIU/ml)	Обхват (mIU/ml)
Дела (от 0 до 12 години)			
• Момчета	20	0,9	0,1 – 2,3
• Момичета	20	2,7	0,4 – 12,7
В пубертетна възраст (от 12 до 18 години)	18	4,5	0,3 – 9,0
Възрастни мъже	69	4,2	1,3 – 8,1
Жени			
Овулаторни цикли			
- Фоликуларна фаза (ден -12 до -6)	34	6,1	1,8 – 9,4
- Овулаторен пик (ден 0)	49	11,9	3,4 – 33,1
- Лutealna фаза (ден +6 до +12)	63	4,3	1,2 – 13,4
Постменопаузален период	53	64,7	27,7 – 93,3

Обхватът се изразява като 2.5% до 97.5% персентила.

XVII. ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Безопасност

Само за *in vitro* диагностика.

Този набор съдържа ^{125}I (полуживот: 60 дни), еmitиращ йонизиращи X (28 keV) и γ (35.5 keV) лъчения.

Този радиоактивен продукт може да се пренася и да се използва само от оторизирани лица; покупката, съхранението, употребата и размяната на радиоактивни продукти са предмет на законодателството на държавата, на краиния потребител. Този продукт не бива в никакъв случай да се прилага на хора или животни.

Боравенето с радиоактивния продукт трябва да се извършва в определена за целта територия, далеч от регуляризи зони на преминаване. В лабораторията трябва да се поддържа дневник за получаването и съхранението на радиоактивни материали. Лабораторната екипировка и стъклария, които могат да бъдат контаминирани с радиоактивни субстанции, трябва да бъдат отделени с цел да се избегне кръстосана контаминация с различни радионизотопи.

Всякакви радиоактивни пръски трябва да се почистват незабавно в съответствие с процедурите за радиационна безопасност. Радиоактивните отпадъци трябва да се изхвърлят, следвайки местните наредби и ръководства на властите, упражняващи юрисдикцията, над лабораториите. Придържането към основните правила за радиационна безопасност осигуряват адекватна защита.

Човешките кръвни компоненти, включени в кита, са били тествани чрез одобрени от Европейски и/или FDA (Американска агенция по храните и лекарствата) методи и са дали отрицателен резултат за HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Няма известен метод, който да дава пълна гаранция за това, че човешките кръвни деривати не пренасят хепатит, СПИН или други инфекции. Ето защо, боравенето със реагентите, serumните или плазмените пробы трябва да бъде в съответствие с местните процедури по безопасност. Всички животински продукти и деривати са били събираны от здрави животни. Волските компоненти са с произход от страни, където BSE (волска serumна енцефалопатия) не е била установявана. Независимо от това, компонентите, съдържащи животински субстанции трябва да се третират като потенциално инфекционни.

Избягайте каквото и да било кожен контакт с реагентите (съдържат натриев азид като консервант). Азидът в този кит може да реагира с оловото и медта във водопроводните инсталации като по този начин се получават силно експлозивни метални азиди. По време на измивния етап, промийте със сила и обилна струя вода канализацията, за да избегнете формирането на азиди.

Не пушете, не пийте, не яжте и не си слагайте козметика в работната територия. Не пипетирайте с уста. Използвайте защитно облекло и ръкавици за еднократна употреба.

XVIII. БИБЛИОГРАФИЯ

- CLARKE J.J., CUMMINS J.T. (1987) *Pulsatility of reproductive hormones: physiological basis and clinical implications.*

Baillière's Clin. Endocrinol. Metab., 1:1

- FILICORI M., SANTORO N., MERRIAN G.R., CROWLEY W.F. Jr., (1986) *Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle.* J. Clin. Endocrinol. Metab., 62:1136
- MAIS V., CETEL N.S., MUSE K.N., QUIGLEY M.E., REID R.L., YEN S.S.C. (1987) *Hormonal dynamics during luteal-follicular transition.* J. Clin. Endocrinol. Metab., 64:1109
- SAWYER-STEFFAN J.E., LASLEY B.L., HOFF J.D., YEN S.S.C. (1982) *Comparison of in-vitro bioactivity and immunoreactivity of serum LH in normal cyclic and hypogonadal women treated with low doses of LH-RH.* J. Reprod. Fertil., 65:45
- THOMAS C.M.G., SEGERS M.F.G. (1988) *Measurement of Serum hLH: hCG interference evaluated for two hLH-Specific IRMA kits.* Clin. Chem., 34:768
- LOUMAYE E., VANKRIEKEN L., DEPREESTER S., PSALTI I., de COOMAN S., THOMAS K. (1989) *Hormonal changes induced by short-term administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and their consequences for embryo development.* Fertil. and Steril., 51:105
- VERMES I., BONTE H.A., SLUIS VEER G., SCHOE MAKER J. (1991) *Interpretations of five monoclonal immunoassays of Lutropin and Follitropin: effects of normalization with WHO standard.* Clin. Chem., 37:415
- DEMOULIN A., DUBOIS M., GERDAY C., GILLAIN D., LAMBOTTE R., FRANCHIMONT P. (1991) *Variation of luteinizing hormone serum concentration after exogenous human chorionic gonadotropin administration during ovarian stimulation.* Fertil. and Steril., 55:796
- MASSA G., de ZECHER F., VANDERSCHUREN-LODEWYK K. (1992) *Serum levels of immunoreactive Inhibine, FSH and LH in human infants at Preterm and Term Birth.* Biol. of the Neonat., 61:150
- DE HERTOGH R., VANKRIEKEN L., THOMAS K. de GASPARO M. (1992) *Circhoral fluctuations of serum total renin, inhibin and related hormones around the mid-cycle in normal human females.* Hum. Reprod., 7:337

XIX. ОБОБЩЕНИЕ НА ПРОТОКОЛА

ОБЩА АКТИВНОСТ ml	КАЛИБРАТОРИ ml	ПРОБА (И) КОНТРОЛИ ml
Калибратори (0-6) Проби, контроли Трейсър	- 0.05	0.1 0.05 0.1 0.05
Инкубация	1 час при стайна температура с разклащане 700 оборота в минута	
Сепарация Измиващ разтвор Сепарация Измиващ разтвор Сепарация	- -	аспиррайте (или прелейте) 2.0 аспиррайте (или прелейте) 2.0 аспиррайте (или прелейте)
Броене	Отчетете епруветките за 60 секунди	

DIAsource FSH-IRMA

II. 제품개요

번호	항 목	내 용
1	품목명	혈증임신·출산호르몬및단백질검사시약
2	제품명	DIAsourc FSH-IRMA
3	허가번호	체외수인 15-275 호
4	사용목적	사람의 여포자극 호르몬 정량 측정
5	포장단위	96 테스트/키트
6	저장방법	2~8 °C , 제조일로부터 63일 (9주)
7	사용기한	2~8 °C , 제조일로부터 63일 (9주)

II. 측정원리

DIAsource FSH-IRMA는 피복-시험관 분리법에 기초한 면역방사계수측정법이다. 포획 항체인 Msbs1은 플라스틱 시험관의 아래쪽 내부에 부착되어 있다. 시험관에 첨가된 표준용액과 검체는 처음에는 Msbs1에 대해 낮은 친화도를 보인다. ^{125}I 으로 표지된 signal 항체인 Mab2의 첨가는 system을 완성하고 면역학적반응을 유발한다. 세척 후, 시험관에 부착된 잔여 방사능은 항원 농도를 반영한다. 몇 개의 서로 다른Msbs를 사용하는 것은 과특이도를 방지한다.

III. 제공되는 시약

번호	명칭	구성	Color Code	재구성
1	Coated tubes	2 x 48	Red	즉시 사용 가능
2	Tracer Anti-FSH- ^{125}I	1 vial, 5.5ml	Red	즉시 사용 가능
3	Calibrator 0	1 vial, 동결건조	Yellow	증류수 2ml 첨가
4	Calibrators 1-6	6 vials, 동결건조	Yellow	증류수 1ml 첨가
5	Wash Solution	1 vial	Brown	증류수로 70배 희석 (자력교반기 사용)
6	Control I, II	2 vials, 동결건조	Silver	증류수 0.5ml 첨가

IV. 측정방법

1. 검체 준비

- (1) 혈청 및 혈장은 2~8°C에 보관한다.
- (2) 측정이 24시간 이내에 이루어지지 않는다면 검체를 소분하여 -20°C에 냉동 보관해야 한다.
- (3) 반복적인 냉동/해동은 피한다.
- (4) 혈청, 혈액 또는 EDTA 혈장으로 비슷한 결과값이 나온다.
 $\text{Y}(\text{serum}) = 1.00 \times (\text{hep. plasma}) + 0.3 \quad r = 0.99, n= 39$
 $\text{Y}(\text{serum}) = 1.02 \times (\text{EDTA plasma}) + 0.3 \quad r = 0.99, n = 39$

2. 시약 조제

- (1) 표준용액: 표준용액 0번은 2ml의 증류수를 첨가하여 재구성하고 나머지 표준용액은 1ml의 증류수를 첨가하여 재구성한다.
- (2) 정도관리 용액: 0.5ml의 증류수를 첨가하여 재구성한다.
- (3) 세척용액: 증류수로 70배 희석한다. 균질화하기 위해 자력교반기를 이용한다.
3. 검사 방법 (* 자동화 장비 : Stratec SR300)
 - (1) 각 calibrator, control, 그리고 검체를 위한 코팅된 시험관을 2개씩 준비하여 라벨을 부착한다. Total count는 2개의 일반 시험관을 준비한다.
 - (2) 간단히 calibrators, 검체 및 control를 vortex 한 후, 100ul씩 준비하여 각 시험관에 분주한다.
 - (3) Total count를 포함한 모든 시험관에 tracer 50ul씩 분주한다.
 - (4) 시험관 랙을 손으로 부드럽게 훑들어 모든 기포를 제거한다.
 - (5) 실온에 700 rpm에 설정된 시험관 shaker로 1시간 동안 반응시킨다.
 - (6) Total count를 제외한 모든 시험관의 내용물을 흡입하여 제거한다. 흡입기의 끝 부분이 바닥에 닿아서 모든 액체가 제거 될 수 있도록 한다.
 - (7) Total count를 제외한 모든 시험관을 희석된 (70배) 2ml의 세척용액으로 세척한다. 희석된 세척용액을 첨가 할 때 거품이 생기지 않도록 한다.
 - (8) Total count를 제외한 모든 시험관의 내용물을 흡입하여 제거한다.

(9) (7)번 & (8)번을 반복한다.

- (10) 마지막 세척 단계 후 약 2분 동안 시험관을 똑바로 세우고 남은 액체를 모두 흡입하여 제거한다.
- (11) 60초 동안 Gamma counter로 cpm을 측정한다.

[체외진단의료기기]

4. 결과 산출

(1) 자료정리

- ① 두 번 측정한 값의 평균값을 구한다.
- ② 각 표준용액의 cpm(세로좌표)에 해당되는 FSH의 농도(가로좌표)로 semi logarithmic 또는 linear 그래프에 표준곡선을 그린다. 이상치는 제외한다.
- ③ 각 control 및 검체의 농도는 보간법으로 표준곡선에서 읽는다.
- ④ 자동으로 계산할 경우 4-Parameter Logistic Function 곡선적합(curve fitting)을 권장한다.

(2) 참고치

구분	대상자의 수	평균값 (mIU/ml)	범위 (mIU/ml)
아동 (0-12세)			
· 남아	20	0.9	0.1 - 2.3
· 여아	20	2.7	0.4 - 12.7
사춘기 (12-18세)	18	4.5	0.3 - 9.0
성인남성	69	4.2	1.3 - 8.1
성인여성			
· 배란 주기			
- 난포기 (월경 6-12일 전)	34	6.1	1.8 - 9.4
- 배란기 (월경 당일)	48	11.9	3.4 - 33.1
- 황체기 (월경 6-12일 후)	63	4.3	1.2 - 13.4
· 폐경기 이후	53	64.7	27.7 - 93.3

5. 표준 데이터

다음 자료는 예시일 뿐, 실제 표준곡선을 대신하여 사용해서는 안 된다.

FSH		cpm	B/T (%)
Total count		362200	100
Calibrator	0.0 mIU/ml 0.7 mIU/ml 3.5 mIU/ml 10.4 mIU/ml 30.0 mIU/ml 100.0 mIU/ml 152.0 mIU/ml	119 1265 2783 8400 28008 102364 160536	0.03 0.35 0.77 2.32 7.73 28.26 44.32

V. 원제품 시험규격

1. 외관검사

제조원의 품질관리표준지침서(문서번호 POCQ075)에 따라 시험하고, 확인양식(문서번호 FTPK004)에 기입하고 확인한다.

- (1) 문서번호 ITPKKIP0841에 기입된 대로 구성품이 일치하는지 확인한다.
- (2) 제품 구성표의 lot와 키트안의 구성품이 일치하는지 확인
- (3) 구성품과 키트의 유효기간을 확인
- (4) 구성품의 라벨상태를 확인
- (5) 구성품의 포장상태를 확인(용량, 물질 등)
- (6) 서류가 맞게 있는지 확인(사용설명서, 품질서류 등)
- (7) 박스에 라벨이 정확히 부착되어 있는지 확인
- (8) 검사 후 담당자는 확인양식(FTPK004)에 기입하고 서명한다.

2. 성능시험

제조원의 품질관리 표준지침서(문서번호 POCQ006)에 따라 시험한다.

- (1) 총 계수는 허용범위 (270,000-380,000 cpm)내에 있어야 한다
- (2) 표준용액 0의 결합률은 허용범위내에 있어야 한다(na-0.1%)
- (3) 표준용액 1의 결합률은 허용범위내에 있어야 한다 (0.05-0.39%)
- (4) 표준용액 5의 결합률은 허용범위내에 있어야 한다 (18.1-34.3%)

(5) 키트 정도관리용액에서 얻어진 값이 허용범위 내에 있어야 한다
control I 10.5-19.5 mIU/ml
control II 28.0-52.0 mIU/ml

- (6) 표준물질은 허용범위 내에 있어야 한다
Calibrator 1 : 0.7-1.3 mIU/ml
Calibrator 2 : 2.1-3.9 mIU/ml

Calibrator 3 : 7.0-13.0 mIU/ml
Calibrator 4 : 21.0-39.0 mIU/ml
Calibrator 5 : 70-130 mIU/ml
Calibrator 6 : 105-195 mIU/ml

비고 : 각 로트의 허용범위는 방사면역 측정을 위한 표준지침서(문서번호 CACQKIP0841)에 기록되어 있다.
(허용범위는 평균값의 $\pm 3SD$ 를 기준으로 측정된다)

VI. 사용시 주의사항

1. 체외진단용으로만 사용하여야 하며, 체외진단용 이외 흡입이나 체내 투여 등을 금지한다.

DIAsource FSH-IRMA [체외진단의료기기]

2. 동 제품에 포함된 방사성동위원소 취급 시 다음 사항을 준수하여야 한다.
 - (1) 방사성동위원소는 지정된 장소에 보관하며, 관련 법령에 따라 자격을 갖춘자가 지정된 장소에서 사용한다.
 - (2) 방사성동위원소를 취급할 때 안전에 영향을 주는 불필요한 행동을 하지 않는다. (예, 음식 섭취, 흡연, 화장 등)
 - (3) 방사성동위원소를 포함한 시약을 분주해야 하는 경우, 입으로 파이펫팅 하지 않는다.
 - (4) 방사성동위원소를 취급할 때에는 장갑 및 실험복을 착용하며, 검사가 완료되면 손을 깨끗이 닦는다.
 - (5) 유출된 모든 물질은 즉시 닦아 낸 후 폐기 또는 취급에 관련된 소관 법령에 따라 처리하여야 하며, 방사성 물질의 오염이나 방사성 물질 등의 분실은 관련 법령에 정한 규정된 절차에 따라 처리한다.
3. 검사를 실시하기 전에 모든 제품(구성품 포함)은 해당 제품별 검사 온도 조건에 따라 실시한다.
4. 그밖에 방사성동위원소의 보관, 이동, 사용 및 폐기 등 취급에 관한 사항은 관련 법규 또는 규정에 따른다.
5. 본 kit 내의 혈액성분은 시험을 거쳤고, HbsAg, 항HIV 1와 항 HIV 2에 대한 반응은 없었다. 알려져 있는 어떠한 방법으로도 간염, AIDS, 감염성혈액 성분 같은 감염성 물질의 부재를 확신시킬 수 없다 그러므로 시약과 환자 검체의 취급은 병원내의 안전절차에 따라야 한다.
6. 시약이 피부에 접촉되지 않게 하라(요오드화나트륨 방부제). 본 kit 내의 요오드화합물은 배관계통의 납과 구리와 반응하여 큰 폭발성을 가진 요오드화금속으로 변화할 수 있다. 세척 단계에서 요오드화합물의 생성을 막기 위해 흐르는 물로 배수관을 씻어 내도록 한다.
7. 방사성물질의 취득과 저장에 대한 일지는 실험실 내에 보관되어야 한다. 방사성 물질로 오염될 수 있는 서로 다른 방사성물질에 의한 교차 오염을 예방하기 위해 실험실 기구와 유리제품은 서로 분리 되어야 한다.
8. 방사성 물질이 쏟아진 경우에는 방사선안전 절차에 따라 즉시 제염하여야 한다. 방사성 폐기물은 특정 규정과 실험실의 관할권을 가지고 있는 신고당국의 지침에 따라 처리되어 야만 한다. 방사선안전에 대한 기본 규칙의 준수는 충분한 방호를 제공한다.