

LH

CE

Only for in-vitro diagnostic use

Instructions for use / Notice d'utilisation / Instrucciones de uso

English	2
Français	7
Español	13
Bibliography / Bibliographie / Bibliografía	19
Abbreviations / Abréviations / Abreviaciones	19
Packaging materials / Matériels d'emballage / Materiales de embalaje	19
Symbols Key / Explication des Symboles / Símbolos.....	20
Summary of Test Procedure / Résumé de la procédure de test / Resumen de la técnica	21

REF

DNOV030 (96 Determinations)

ENGLISH

1. INTRODUCTION

Luteinizing hormone (LH) is a glycoprotein consisting of two subunits with a molecular mass of 30,000 daltons. The α -subunit is similar to other pituitary hormones [follicle stimulating hormone (FSH), thyroid stimulating hormone (TSH) and chorionic gonadotropin (HCG)] while the β -subunit is unique. The β -subunit confers the biological activity to the molecule.

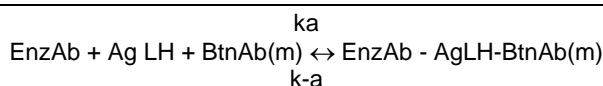
The α -subunit consists of 89 amino acid residues while the β -subunit contains 129 amino acids. The carbohydrate content is between 15% and 30%. The clinical usefulness of the measurement of luteinizing hormone (LH) in ascertaining the homeostasis of fertility regulation via the hypothalamic-pituitary-gonadal axis has been well established^{1,2}. In addition, the advent of in vitro fertilization (IVF) technology to overcome infertility associated problems has provided the impetus for rapid improvement in LH assay methodology from the technically demanding bioassay³ to the procedurally simple and rapid immunoenzymometric assays.

2. INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method (ELISA) for quantitative determination of LH in human serum or plasma from an adult population.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

In this method, LH standards, patient specimens and/or controls (containing the native antigen) are first added to streptavidin coated wells. Biotinylated monoclonal and enzyme labelled antibodies are added and the reactants mixed: these antibodies have high affinity and specificity and are directed against distinct and different epitopes of LH. Reaction between the various LH antibodies and native LH occurs in the microwells without competition or steric hindrance forming a soluble sandwich complex. The interaction is illustrated by the following equation:



BtnAb(m) = Biotinylated Monoclonal Antibody (Excess Quantity)

AgLH = Native Antigen (Variable Quantity)

EnzAb(p) = Enzyme labelled Antibody (Excess Quantity)

EnzAb(p)-AgLH-BtnAb(m) = Antigen-Antibodies Sandwich Complex

ka = Rate Constant of Association

k-a = Rate Constant of Dissociation

Simultaneously, the complex is deposited to the well through the high affinity reaction of streptavidin and biotinylated antibody. This interaction illustrated below:



Streptavidin C.W. = Streptavidin immobilized on well.

Immobilized complex = Antibodies-Antigen sandwich bound.

After equilibrium is attained, the antibody-bound fraction is separated from unbound antigen by decantation or aspiration. The enzyme activity in the antibody-bound fraction is directly proportional to the native antigen concentration. The activity of the enzyme present on the surface of the well quantitated by reaction with a suitable substrate to produce colour. By utilizing several different calibrators of known antigen values, a dose response curve can be generated from which the antigen concentration of an unknown can be ascertained.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Microtiterplate:** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with Streptavidin; in resealable aluminium foil.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.15 mol/L (avoid any skin contact), ready to use.
- **Conjugate:** 1 bottle containing 12 mL of horseradish peroxidase labelled anti-LH antibodies and Biotin labelled anti-LH antibodies, contains < 0.06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1), BSA 0.1 %.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (H₂O₂-TMB 0.26g/L) (avoid any skin contact); contains < 0.0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **Wash solution 50x conc:** 1 bottle containing 20 mL NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L; contains < 0.06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **Control:** 1 bottle containing 1 mL of a lot-specific control solution. The concentration is mentioned on the label; contains < 0.06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1), BSA 1 %.
- **Standards:** 6 bottles, 1 mL each; contain < 0.06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1), BSA 1 % and have approx. the following concentrations:
 - Standard 0: 0 mIU/mL
 - Standard 1: 5 mIU/mL
 - Standard 2: 25 mIU/mL
 - Standard 3: 50 mIU/mL
 - Standard 4: 100 mIU/mL
 - Standard 5: 200 mIU/mL

For hazard and precautionary statements see 13.1.

4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instructions for use (IFU)

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450, 620-630 nm
- Pipettes to deliver 50 µL with a precision better than 1.5%
- Dispenser(s) for repetitive deliveries of 0.100 mL and 0.300 mL volumes with a precision of better than 1.5%.
- Microplate automatic washer or a squeeze bottle (optional).
- Distilled or deionized water and a clean one litre cylinder for the dilution of the wash solution
- Absorbent Paper for blotting the microplate wells.
- Vacuum aspirator (optional) for wash steps.
- Timer
- Quality control materials.

5. STABILITY AND STORAGE

The originally closed reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at +2...+8 °C in the dark.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and standards to room temperature (+22...+28°C) for at least 30 minutes before starting the test run! At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C; avoid long exposure to room temperature.

6.1. Microtiterplate

The ready to use break apart snap-off strips are coated with Streptavidin. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at +2...+8 °.*

6.2. Conjugate

The conjugate is ready to use.

6.3. Control

The bottle contains 1 mL of a lot-specific control solution. The concentration is indicated on the label. Before use, mix for 5 minutes with a rotating mixer. The control is ready to use.

6.4. Standards

Before use, mix for 5 minutes with a rotating mixer. The standards are ready to use. Once opened the standards are stable for 6 months at 2...8° C.

6.5. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 mL of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8°C in the dark. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.*

6.6. Wash Solution

Dilute contents of wash buffer concentrate 50x to 1000 mL with distilled or deionised water in a suitable storage container. For smaller volumes respect the 1:50 ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2...8°C.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- The specimens shall be blood, serum in type and the usual precautions in the collection of venipuncture samples should be followed.
- For accurate comparison to established normal values, a fasting morning serum sample should be obtained.
- The blood should be collected in a venipuncture tube without additives or anti-coagulants. Allow the blood to clot. Centrifuge the specimen to separate the serum from the cells.
- Samples may be refrigerated at +2...+8°C for a maximum period of 5 days. If the specimen(s) cannot be assayed within this time, the sample(s) may be stored at -20°C for up to 30 days.
- Avoid repetitive freezing and thawing.
- When assayed in duplicate, 40 µL of the specimen is required.

7.1. Precaution

- Maximum precision is required for dispensation of the reagents.
- This method allows the determination of LH from 5 mIU/mL to 200 mIU/mL.
- Samples with concentration of LH higher than 200 mIU/mL have to be diluted with standard 0.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test instructions for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instructions for use as described Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and standards should be carefully established. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve. Please allocate at least:

1 well	(e.g. A1)	for the substrate blank
2 wells	(e.g. B1+C1)	for standard 0
2 wells	(e.g. D1+E1)	for standard 1
2 wells	(e.g. F1+G1)	for standard 2
2 wells	(e.g. H1+A2)	for standard 3
2 wells	(e.g. B2+C2)	for standard 4
2 wells	(e.g. D2+E2)	for standard 5
2 wells	(e.g. F2+G2)	for LH control

It is recommended to determine standards and patient samples in duplicate.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard and each patient sample.

1. Dispense 20 µL standards, control and samples into their respective wells. Add 100 µL conjugate to each well. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour at room temperature (22...28°C).**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µL diluted wash solution. Avoid overflows from the reaction wells.

Important note: During each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.

Automatic washer: In case you use automatic equipment, wash the wells at least 5 times.

Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.

5. Dispense 100 µL TMB Substrate Solution into all wells.
6. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (22...28°C) in the dark.**
7. Dispense 100 µL Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution. Shake the microplate gently.
Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.
8. Measure the absorbance of the specimen at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against blank within 5 minutes.

9. QUALITY CONTROL

Good Laboratory Practice (GLP) requires the use of quality control specimens in each series of assays in order to check the performance of the assay. Controls should be treated as unknown samples, and the results analysed with appropriate statistical methods.

The control provided in the kit should be tested as unknown and are intended to assist in assessing the validity of results obtained with each assay plate.

We recommend the users to maintain graphic records of the control values generated with each assay run, including the running means, SDs and %CVs. This information will facilitate the controls trending analysis relating to the performance of current and historical control lots relative to the supplied Quality Control data. The trending will assist in the identification of assays which give control values significantly different from their average range.

When interpreting control data, users should note that this product was designed and developed as a manual product. The range stated on the Certificate of Analysis (CoA) should be appropriate for assays that are performed manually and with strict adherence to the Assay Procedure described above. It is recognised by Quality Control professionals, that as a result of differences in conditions and practices, there will always be variability in the mean values and precision of control measurements between different laboratories⁸.

10. RESULTS

10.1. Calculation of results

A variety of data reduction software packages are available, which may be employed to generate the mean calibration curve and to calculate the mean concentrations of unknown samples and controls. A 4-parameter logistic (4PL) curve fit, **including Standard 0 is required**. A smoothed spline fit including Standard 0 can be used. Other curve fitting algorithms are not recommended.

Alternatively, a calibration curve may be prepared on semi-log graph paper by plotting mean absorbance on the Y-axis against concentration of analyte on the X-axis. Standard 0 should be included in the calibration curve. Read the mean absorbance value of each unknown sample off the curve.

In order for the assay results to be considered valid the kit standards and control must fall within the specifications detailed in the lot specific certificate of analysis.

If a control is out of its specified range, the associated test results are invalid, and samples must be retested.

10.2. Reference values

The serum LH values are comprised in the following intervals:

Men	0.7 – 7.4 mIU/mL
Women	
follicular phase	0.5 – 10.5 mIU/mL
Ovulation phase	18.4 – 61.2 mIU/mL
luteal phase	0.5 – 10.5 mIU/mL
menopause	8.2 – 40.8 mIU/mL

It is important to keep in mind that establishment of a range of values which can be expected to be found by a given method for a population of "normal"-persons is dependent upon a multiplicity of factors: the specificity of the method, the population tested and the precision of the method in the hands of the analyst.

For these reasons each laboratory should depend upon the range of expected values established by the Manufacturer only until an in-house range can be determined by the analysts using the method with a population indigenous to the area in which the laboratory is located.

11. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Precision

Intra Assay Variation

Within-run precision was determined by replicate determinations (20x) of three different control sera in one assay. The within-assay variability is $\leq 9.21\%$

Inter Assay Variation

Between-run precision was determined by replicate measurements of three different control sera in 15 different assays. The between-assay variability is $\leq 7.91\%$

11.2. Accuracy

The recovery test performed on three different samples, enriched with 5.63 - 11.25 - 22.5 - 45 - 90 mIU/mL of LH, gave a average value (\pm SD) of $97.17\% \pm 4.00\%$.

In the dilution test three different samples were diluted 2, 4, 8 and 16 times with Standard 0; the average value (\pm SD) obtained is $99.13\% \pm 7.37\%$.

11.3. Specificity

The cross-reactivity of the LH kit to selected substances was evaluated by adding the interfering substance to a serum matrix at various concentrations. The cross-reactivity was calculated by deriving a ratio between dose of interfering substance to dose of Luteinizing Hormone needed to produce the same absorbance.

Substance	Cross Reactivity
LH	100%
HCG	0.007%
Prolactin	None detected
FSH	None detected
TSH	None detected

11.4. Sensitivity

The minimal detectable concentration of LH by this assay is estimated to be 0.22 mIU/mL.

11.5. Correlation

The LH kit was compared to a commercially available LH kit. 36 serum samples were tested.

The regression curve is:

$$\text{GSD} = 0.91 * (\text{commercial kit}) + 0.05$$

$$R^2 = 0.971$$

The new LH kit was compared to the old LH kit. 36 serum samples were tested.

The regression curve is:

$$(\text{new}) = 1.08 * (\text{old}) - 1.22$$

$$R^2 = 0.981$$

11.6. Hook Effect

The LH assay shows no Hook Effect up to 400 mIU/mL.

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values.
- LH is suppressed by estrogen but in woman taking oral contraceptives the level may be low or normal. Excessive dieting and weight loss may lead to low gonadotropin concentrations. Luteinising hormone is dependent upon diverse factors other than pituitary homeostasis; thus, the determination alone is not sufficient to assess clinical status.
- As in the case of any diagnostic procedure, results must be interpreted in conjunction with the patient's clinical presentation and other information available to the physician.
- The performance characteristics of this assay have not been established in a paediatric population.

- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with *in vitro* immunoassays⁹. Patients routinely exposed to animals or to animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed.


13. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use by professional persons. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic, icteric or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- Some reagents (standards, control, conjugate, and wash solution) contain small amounts of CMIT/MIT as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Avoid the exposure of TMB substrate to direct sunlight, metal or oxidants. Do not freeze the solution.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

13.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) (refer to 4.1)

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

Warning 	H317	May cause an allergic skin reaction.
	P261	Avoid breathing gas/mist/vapours/spray.
	P280	Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
	P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of water.
	P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.
	P362+P364	Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

Further information can be found in the safety data sheet.

13.2. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

For information about the packaging materials refer to PACKAGING MATERIALS.

14. ORDERING INFORMATION

REF	DNOV030	LH	(96 Determinations)
-----	---------	----	---------------------

FRANÇAIS

1. INTRODUCTION

L'hormone de lutéinisation (LH est une glycoprotéine constituée de sous-unités ayant un poids moléculaire d'environ 30 000 daltons. La sous-unité α est semblable à celle des autres hormones hypophysaires [hormone folliculo-stimulante (FSH), hormone thyroïdienne (TSH) et gonadotropine chorionique (HGC)] tandis que la sous-unité β est unique. Elle confère son activité biologique à la molécule. La sous-unité α est constituée de 89 résidus d'acides aminés tandis que la sous-unité β contient 129 acides aminés. Le contenu en carbohydrates varie de 15 à 30 %. L'utilité clinique de la détermination de l'hormone de lutéinisation (LH) dans le contrôle de l'homéostasie de la régulation de la fertilité à travers l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique a été largement démontrée^{1,2}. De plus, l'apparition des technologies relatives à la fécondation *in vitro* (IVF) permettant de résoudre les problèmes de manque de fertilité a donné un élan supplémentaire au développement rapide des méthodes de détermination de la LH : on est ainsi passé de l'essai biologique techniquement complexe³ à un essai plus simple et rapide de type immunoenzymatique.

2. INDICATION D'UTILISATION

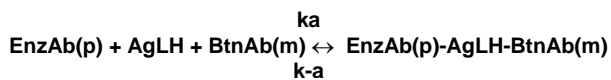
Méthode immunoenzymatique colorimétrique (ELISA) pour la détermination quantitative de l'hormone de LH dans le sérum ou le plasma humain d'une population adulte.

3. PRINCIPE DU DOSAGE

Selon cette méthode, les étalons, les échantillons et/ou les contrôles (contenant l'antigène LH natif), sont ajoutés aux puits de la microplaque sensibilisés à la streptavidine. Ensuite, on ajoute dans les puits, en excès, des anticorps anti-LH monoclonaux biotinylés ainsi que des anticorps conjugués enzymatiques ; les deux types d'anticorps sont à grande affinité et spécificité et reconnaissent divers épitopes.

La réaction entre l'antigène natif et les anticorps a lieu sans compétition ou encombrement stérique dans les puits de la microplaque et un complexe *sandwich* soluble se forme.

L'interaction est représentée par l'équation suivante:



BtnAb(m) = Anticorps monoclonal biotinylé (en excès)

AgLH = Antigène natif (quantité variable)

EnzAb = Anticorps marqué aux enzymes (en excès)

EnzAb-AgLH-BtnAb(m) = Complexe sandwich antigène-anticorps

k_a = Constante d'association

k_{-a} = Constante de dissociation

Le complexe se dépose simultanément sur le puits suite à la réaction par affinité entre la streptavidine et l'anticorps biotinylé. Cette interaction est décrite ci-dessous:

EnzAb -AgLH-BtnAb(m) + Streptavidine C.W. ⇒ complexe immobilisé

Streptavidine C.W. = Streptavidine immobilisée sur le puits

Complexe immobilisé = Liaison sandwich anticorps-antigène lié à la surface

Une fois l'équilibre atteint, la fraction liée de l'anticorps se sépare de l'antigène non réagi par décantation ou aspiration. L'activité enzymatique dans la fraction liée à l'anticorps est directement proportionnelle à la concentration de l'antigène natif libre. L'activité de l'enzyme est quantifiée à travers la réaction avec un substrat produisant un changement de couleur. Au moyen de divers étalons à concentration d'antigène connue, il est possible de tracer une courbe dose/réponse permettant de déterminer la concentration inconnue d'antigène.

4. MATERIELS

4.1. Réactifs fournis

- **Plaque de Microtitrage:** 12 bandes détachables enduites de Streptavidine de 8 puits, en sachet d'aluminium refermable.
- **Solution stop:** 1 flacon contenant 15 mL d'acide sulfurique, 0,15 mol/L (éviter tout contact avec la peau); prête à l'emploi.
- **Conjugué:** 1 flacon contenant 12 mL d'anticorps anti-LH conjugué avec de la peroxydase de raifort (HRP) et anticorps anti LH-Biotine conjugué; contient < 0,06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1) et de 0,1 % BSA.
- **Solution de TMB:** 1 flacon contenant 15 mL de 3, 3', 5, 5'-Tétraméthylbenzidine (H₂O₂-TMB 0.26g/L) (éviter tout contact avec la peau) ; contient < 0,0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **Solution de lavage concentrée (50x):** 1 flacon contenant 20 mL NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L ; contient < 0,06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **Contrôle:** 1 flacon contenant 1 mL d'un lot spécifique solution de contrôle prête à l'emploi. La concentration est indiquée sur l'étiquette; contient < 0,06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1) et de 1 % BSA.

- **Etalons:** 6 flacons, 1 mL chacun; contient < 0,06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1) et de 1 % BSA. Les etalons présentent les concentrations suivantes:

Etalon 0:	0 mIU/mL
Etalon 1:	5 mIU/mL
Etalon 2:	25mIU/mL
Etalon 3:	50mIU/mL
Etalon 4:	100 mIU/mL
Etalon 5:	200 mIU/mL

Pour les mentions de danger et les conseils de prudence voir chapitre 13.1.

4.2. Matériels fournis

- 1 couvercle autocollante
- 1 notice d'utilisation

4.3. Matériels et équipements requis

- Lecteur de microplaques ELISA, pour mesure l'absorbance à 450, 620-630 nm
- Equipement manuel ou automatique pour le rinçage des puits (optionnel)
- Pipettes permettant de délivrer un volume de 50 µL (précision mieux que 1,5 %).
- Pipettes répétitives pour volumes de 0,100 mL y 0,300 mL avec une précision plus que 1,5 %
- Eau distillée ou eau déionisé
- Papier absorbant pour sécher les puits de la microplaque
- Chronomètre
- Matériel pour le contrôle qualité

5. STABILITE ET CONSERVATION

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette s'ils sont conservés entre 2°C et 8 °C à l'obscurité.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient portés à température ambiante (22°C–28 °C) pour au moins 30 minutes avant de commencer le dosage! À la fin de l'essai conservent les réactifs immédiatement à 2-8 °C ; évitez la longue exposition à température ambiante.

6.1. Plaque de Microtitrage

Les bandes détachables sont enduites de Streptavidine et sont prêtes à l'emploi. Conserver entre 2°C et 8°C. *Après avoir prélevé les bandes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et les conserver entre 2°C et 8°C.*

6.2. Conjugué

Le conjugué est prêt à l'emploi.

6.3. Contrôle

1 flacon prêt à l'emploi contenant 1 mL d'un lot spécifique. La concentration est indiquée sur l'étiquette. Avant utilisation, mélanger pendant 5 minutes à l'aide d'un mélangeur rotatif.

6.4. Etalons

Avant utilisation, mélanger pendant 5 minutes à l'aide d'un mélangeur rotatif. Les étalons sont prêts à l'emploi. Une fois ouverts, ils sont stables pendant 6 mois à 2°C et 8°C.

6.5. Solution TMB

Le flacon contient 15 mL d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. Le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé 2°C et 8°C à l'obscurité. *La solution doit être incolore ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et doit être remplacé.*

6.6. Solution de lavage

Diluer la solution de lavage de 1000 mL avec de l'eau distillée dans un récipient adapté. Respecter le ratio 1:50 pour les lus petits volumes. *La solution de lavage diluée est stable pendant 30 jours entre 2°C et 8°C.*

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

- Utiliser des échantillons de sérum ou plasma et observer les précautions habituelles dans le recueil des échantillons provenant d'un prélèvement par voie veineuse.
- Pour une analyse approfondie permettant d'établir des valeurs dans la norme, recueillir les échantillons de sérum ou plasma le matin et à jeun.
- Pour obtenir le sérum le sang doit être recueilli dans un tube de prélèvement par voie veineuse, sans additifs ou anticoagulants. Attendre que le sang coagule. Mettre l'échantillon à centrifuger pour séparer le sérum des cellules.

- Les échantillons peuvent être réfrigérés à 2-8°C pendant une période maximale de 5 jours. S'il n'est pas possible de tester les échantillons dans cette période, ceux-ci peuvent être conservés à des températures allant jusqu'à -20°C et sur une période allant jusqu'à 30 jours.
- Éviter les cycles répétés de congélation/décongélation.
- Si testés en double, une quantité de 40 µL d'échantillon est nécessaire.

7.1. Précaution

- Un maximum de précaution est nécessaire pour l'utilisation des réactifs.
- Cette méthode permet la détermination de LH de 5 mIU/mL à 200 mIU/mL.
- Pour les échantillons avec des concentrations dépassant 200 mIU/mL, diluer l'échantillon avec l'étalon 0.

8. PROCÉDE DU DOSAGE

8.1. Préparation du dosage

Lire attentivement la notice d'utilisation **avant de** réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict d'utilisation comme décrit. Avant de commencer le dosage, déterminer, le plan de distribution et d'identification des échantillons et des contrôles. Sélectionner le nombre de bandes ou de puits nécessaires et les placer sur le support. Réserver au moins:

1 puits	(ex. A1)	Pour le blanc
2 puits	(ex. B1+C1)	Pour l'étalon 0
2 puits	(ex. D1+E1)	Pour l'étalon 1
2 puits	(ex. F1+G1)	Pour l'étalon 2
2 puits	(ex. H1+A2)	Pour l'étalon 3
2 puits	(ex. B2+C2)	Pour l'étalon 4
2 puits	(ex. D2+E2)	Pour l'étalon 5
2 puits	(ex. F2+G2)	Pour le contrôle

Il est recommandé de déterminer les contrôles et les échantillons du patient en doubles.

Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans interruption entre les étapes.

Un cône de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque contrôle et échantillon.

1. Pipeter 20 µL des étalons, de Control et d'échantillons dans leurs puits respectifs. Ajouter 100 µL de conjugué dans chaque puits. Garder le puits A1 pour le blanc.
2. Couvrir les puits avec le couvercle fourni dans le kit.
3. **Incuber pendant 1 heure à température ambiante (22 – 28°C).**
4. À la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µL de solution de lavage diluée. Éviter les débordements de puits de réaction. Pendant chaque pas de lessive, secouez doucement la plaque depuis 5 secondes et enlevez la solution d'excès en tapant la plaque inversée sur un essuie-mains en papier absorbant.

Équipement automatisé : Si vous utilisez l'équipement automatisé, lavez les puits au moins 5 fois.

Note : *L'étape de lavage est très importante ! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et des valeurs d'absorbance faussement élevées.*

5. Pipeter 100 µL de solution de TMB dans tous les puits.
6. **Incuber pendant exactement 15 min à température ambiante (22 – 28°C) à l'obscurité.**
7. Pipeter 100 µL de solution stop dans tous les puits dans le même ordre à la même vitesse que pour la solution de TMB. Secouer doucement la microplaque.
La couleur bleue développée pendant l'incubation vire au jaune.
8. Mesurer l'absorbance des échantillons à 450 nm contre une longueur d'onde de référence de 620-630 nm ou contre le blanc au cours de 5 minutes.

9. CONTROLE QUALITE

Les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) exigent l'utilisation d'échantillons de contrôle de qualité dans chaque série de tests afin de vérifier la performance du test. Les contrôles doivent être traités comme des échantillons inconnus, et les résultats analysés à l'aide de méthodes statistiques appropriées.

Le contrôle fourni dans le kit doivent être testés comme des inconnus et sont destinés à aider à évaluer la validité des résultats obtenus avec chaque plaque de test.

Nous recommandons aux utilisateurs de conserver des enregistrements graphiques des valeurs de contrôle générées par chaque essai, y compris les moyennes courantes, les écarts types et le %CV. Cette information facilitera l'analyse des tendances des contrôles concernant la performance des lots de contrôle actuels et historiques par rapport aux données de contrôle de la qualité fournies. L'analyse des tendances permettra d'identifier les essais qui donnent des valeurs de contrôle significativement différentes de leur plage moyenne.

Lors de l'interprétation des données de contrôle, les utilisateurs doivent noter que ce produit a été conçu et développé comme un produit manuel. La plage indiquée sur le *Certificate of Analysis (CoA)* doit être appropriée pour les analyses effectuées manuellement et en respectant strictement la procédure d'analyse décrite ci-dessus. Les professionnels du contrôle qualité reconnaissent qu'en raison des différences de conditions et de pratiques, il y aura toujours une variabilité des valeurs moyennes et de la précision des mesures de contrôle entre les différents laboratoires⁸.

10. RESULTATS

10.1. Calcul des résultats

Il existe divers logiciels de réduction des données, qui peuvent être utilisés pour générer la courbe d'étalonnage moyenne et calculer les concentrations moyennes des échantillons inconnus et des contrôles. Un ajustement de courbe logistique à 4 paramètres (4PL), **avec étalon 0 est recommandé**. Un ajustement par spline lissée incluant l'étalon 0 peut être utilisé. D'autres algorithmes d'ajustement de courbe ne sont pas recommandés.

On peut également préparer une courbe d'étalonnage sur du papier graphique semi-logarithmique en traçant un graphique avec l'absorbance moyenne sur l'axe des ordonnées en fonction de la concentration de l'analyte sur l'axe des abscisses. L'étalon 0 doit être inclus dans la courbe d'étalonnage. Lire la valeur d'absorbance moyenne de chaque échantillon inconnu sur la courbe. Pour que les résultats de l'analyse soient considérés comme valables, les étalons du kit et le contrôle doivent se situer dans les limites des spécifications indiquées dans le Certificate of Analysis spécifique au lot.

Si un contrôle se situe en dehors de la plage spécifiée, les résultats du test associé ne sont pas valables et les échantillons doivent être testés à nouveau.

10.2. Valeurs de Référence

Les concentrations de LH dans le sérum ou le plasma sont comprises dans les intervalles suivantes:

	LH (mIU/mL)
HOMMES :	0,7 – 7,4
FEMMES :	
Phase folliculaire	0,5 – 10,5
Phase ovulatoire	18,4 – 61,2
Phase lutéinique	0,5 – 10,5
Ménopause	8,2 – 40,8

Prenez garde au fait que la détermination d'une gamme de valeurs attendues pour une population "normale" d'une méthode donnée dépend de plusieurs facteurs, comme la spécificité et la sensibilité de la méthode utilisée et le genre de population étudiée. Par conséquent chaque laboratoire doit considérer que la gamme donnée comme une indication générale par le fabricant et produit sa propre gamme de valeurs attendues basée sur la population où est situé le laboratoire.

11. PERFORMANCE DU DOSAGE

11.1. Précision

Variation Intra Dosage

La variation intra dosage a été déterminée par un répliquant (20x) sur trois sérums différents dans un dosage. La variation intra dosage est $\leq 9,21\%$.

Variation Inter Dosage

La variation inter dosage a été déterminée en répliquant la mesure de trois sérums de contrôle différents en 15 lots différents. La variation inter dosage est $\leq 7,91\%$.

11.2. Exactitude

L'épreuve de récupération conduite sur des échantillons enrichis avec 5,63 - 11,25 - 22,5 - 45 - 90 mIU/mL de LH a donné une valeur moyenne (\pm SD) de $97,17\% \pm 4,00\%$.

Trois différents échantillons ont été dilués 2 - 4 - 8 - 16 fois avec l'étalon 0; le valeur moyenne (\pm SD) est $99,13\% \pm 7,37\%$.

11.3. Spécificité analytique

La réactivité croisée du LH kit à l'égard de la substance responsable d'interférences potentielles a été estimée en ajoutant lesdites substances, à des concentrations différentes, à une matrice de sérum. La réactivité croisée a été calculée au moyen du rapport entre dose de substance interférente et dose d'hormone de lutéinisation nécessaire pour produire la même DO.

Substance testée	Réactivité croisée
LH	100 %
HCG	0,007 %
Prolactine	N.D.
FSH	N.D.
TSH	N.D.

11.4. Sensibilité Analytique

La plus petite concentration détectable de LH par ce test est estimée 0,22 mIU/mL.

11.5. Comparaison de méthode

Le LH ELISA kit a été comparé avec un test disponible en commerce. 36 échantillons de sérum ont été testés.

La courbe de régression est:

$$Y = 0,91 \cdot X + 0,05$$

$$r^2 = 0,971$$

Le nouveau LH ELISA kit a été comparé avec le kit LH ELISA précédent. 36 échantillons de sérum ont été testés.

Les courbes de régression sont les suivantes:

$$Y = 1,08 \cdot X - 1,22$$

$$r^2 = 0,981$$

11.6. Effet « Hook »

Dans cette méthode, aucun effet crochet n'a été observé jusqu'à 400 mIU/mL.

12. LIMITES DE LA PROCÉDURE

- Une contamination bactérienne ou des cycles répétés de congélation-décongélation de l'échantillon peuvent affecter les valeurs d'absorbance.
- L'hormone LH est supprimée par les œstrogènes, mais les taux relevés chez les femmes prenant des contraceptifs par voie orale peuvent être bas ou normaux. Des régimes trop radicaux ou des pertes de poids brusques peuvent faire baisser la concentration de gonadotropine. L'hormone de lutéinisation dépend de facteurs différents de l'homéostasie hypophysaire. Par conséquent, il ne suffit pas de se limiter à une détermination pour effectuer une évaluation de l'état clinique.
- Comme pour toute procédure diagnostique, les résultats doivent être interprétés en fonction de la présentation clinique du patient et des autres informations dont dispose le médecin.
- Les caractéristiques de performance de ce test n'ont pas été établies dans une population pédiatrique.
- Les anticorps hétérophiles présents dans le sérum humain peuvent réagir avec les immunoglobulines réactives et interférer avec les tests immunologiques *in vitro*⁹. Les patients régulièrement exposés à des animaux ou à des produits sériques d'origine animale peuvent être sujets à cette interférence et des valeurs anormales peuvent être observées.

13. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- La procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde du mode d'emploi doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces kits avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces modifications. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic *in vitro*. Ne pas utiliser pour usage interne ou externe chez les Humains ou les Animaux.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été testés non réactifs aux antigènes HBs, en anticorps anti-VIH et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les bandes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de ce kit.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des cônes de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer les flacons de réactifs immédiatement après l'utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Les échantillons microbiologiquement contaminés, hautement lipémiques, ictériques ou hémolysés ne doivent pas être utilisés pour le dosage.
- Les lecteurs de microplaques mesurent verticalement. Ne pas toucher le fond des puits.
- Il est important de maintenir constants les temps de réaction dans chaque puits afin d'obtenir les résultats susceptibles d'être répétés. Le pipetage des échantillons ne doit pas durer plus de 10 minutes afin d'éviter tout résultat incorrect. S'il se prolonge au-delà des 10 minutes, il est recommandé de suivre l'ordre de distribution. Si vous devez utiliser plus d'une microplaque, il est conseillé de répéter la courbe dose-réponse.
- Si le liquide n'est pas complètement extrait des puits, cela peut influencer la précision du dosage et/ou augmenter le bruit de fond. Pour améliorer la performance du kit sur les systèmes automatiques ELISA, on recommande d'augmenter le nombre de se lave.
- Certains réactifs contiennent de petites quantités de CMIT/MIT comme conservateur. Eviter tout contact avec peau et les muqueuses.
- Le TMB est irritant, ce qui peut être nocif s'il est inhalé, ingéré ou absorbé à travers la peau. Eviter toute inhalation, ingestion ou contact avec la peau et les yeux pour prévenir de ces risques.
- La solution stop est une solution d'acide sulfurique diluée. L'aide sulfurique est un poison corrosif et peut être toxique s'il est ingéré. Eviter tout contact avec la peau ou les yeux pour prévenir des brûlures chimiques.
- L'addition de la solution de substrat initie la réaction cinétique qui se termine par l'ajout de solution stop. Par conséquent, l'addition de solution de substrat et de solution stop doit être faite durant la manipulation pour éliminer tous risques de dépassement de la durée de réaction.
- Éviter toute exposition du réactif TMB à la lumière directe du soleil, à des métaux ou à des agents oxydants. Ne pas congeler la solution.
- Suivre la notice pour les contrôles qualité dans les laboratoires médicaux en dosant les contrôles et/ou les sérums.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits en évitant les éclaboussures.
- Ce test ELISA est destinée à un personnel qualifié qui est familiarisé avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

AVERTISSEMENT:	L'acide sulfurique est irritant pour les yeux et la peau. Garder hors de la portée des enfants. En cas de contact avec les yeux, rincer soigneusement avec de l'eau et consulter un médecin !
----------------	--

13.1. Note de sécurité pour les réactifs contenant des substances dangereuses

Les réactifs peuvent contenir du CMIT/MIT (3:1) (voir chapitre **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**)
Par conséquent, les mentions de danger et les conseils de prudence suivants s'appliquent.

Attention



H317	Peut provoquer une allergie cutanée.
P261	Éviter de respirer les aérosols.
P280	Porter des gants de protection/ des vêtements de protection.
P302+P352	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: Laver abondamment savon à l'eau.
P333+P313	En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin.
P362+P364	Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

De plus amples informations peuvent être trouvées dans la fiche de données de sécurité.

13.2. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

Pour plus d'informations sur les matériaux d'emballage, reportez-vous à la section MATÉRIELS D'EMBALLAGE.

14. INFORMATION POUR LES COMMANDES

REF

DNOV030

LH (96 Dosages)

ESPAÑOL

1. INTRODUCCIÓN

La hormona luteinizante (LH) es una glicoproteína compuesta por subunidades de peso molecular de aproximadamente 30 000 dalton. La subunidad α es similar a la de las otras hormonas pituitarias [hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y gonadotropina coriónica (HCG)], mientras que la subunidad β es única. Esta confiere a la molécula la actividad biológica. La subunidad α consta de 89 residuos de aminoácidos, mientras que la subunidad β contiene 129 aminoácidos. El contenido de carbohidratos varía del 15% al 30%. La utilidad clínica de la determinación de la hormona luteinizante (LH) en la evaluación de la homeostasis de la regulación de la fertilidad a través del eje hipotalámico-pituitario-gonadal ha sido ampliamente demostrada^{1,2}. Además, la aparición de las tecnologías relacionadas con la fecundación *in vitro* (FIV) dirigidas a la resolución de problemas de infertilidad ha dado un nuevo impulso al rápido desarrollo de métodos para la determinación de la LH: desde el ensayo biológico técnicamente complejo³ hasta el ensayo más simple y rápido de tipo inmunoenzimático.

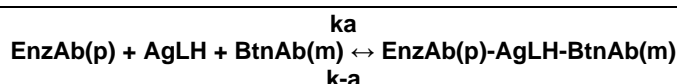
2. USO

Método inmunoenzimático competitivo y colorimétrico para la determinación cuantitativa de LH en suero o plasma humano de una población adulta.

3. FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

En este método, los calibradores, muestras y/o controles (que contienen el antígeno LH nativo), se añaden a los pocillos de la microplaca sensibilizados con estreptavidina. A continuación, se añaden a los pocillos, en exceso, anticuerpos anti-LH monoclonales biotinilados y anticuerpos conjugados con la enzima; ambos tipos de anticuerpos son de alta afinidad y especificidad, y reconocen epítomos distintos. En los pocillos de la microplaca, la reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos se produce sin competencia o impedimento estérico, y se forma un complejo sándwich soluble.

La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:



BtnAb(m) = anticuerpo biotinilado monoclonal (en exceso)

AgLH = antígeno nativo (cantidad variable)

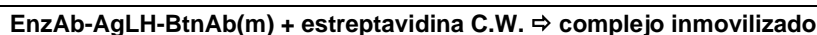
EnzAb = anticuerpo marcado con una enzima (en exceso)

EnzAb-AgLH-BtnAb(m) = complejo sándwich antígeno-anticuerpos

ka = constante de asociación

k-a = constante de disociación

Al mismo tiempo, el complejo se deposita en el pocillo mediante la reacción de alta afinidad de la estreptavidina y el anticuerpo biotinilado. Esta interacción se ilustra a continuación:



Estreptavidina C.W. = estreptavidina inmovilizada en el pocillo

Complejo inmovilizado = enlace sándwich anticuerpo-antígeno unido a la superficie

Tras lograr el equilibrio, la fracción unida del anticuerpo se separa del antígeno no unido mediante un lavado.

La actividad enzimática en la fracción unida del anticuerpo es directamente proporcional a la concentración de antígeno nativo libre. La actividad enzimática se cuantifica mediante la reacción con un sustrato que produce una coloración. Usando distintos calibradores de concentración conocida de antígeno se puede generar una curva dosis-respuesta con la que se puede determinar la concentración desconocida del antígeno.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Placa de Microtitulación:** 12 tiras de 8 pozos separables. Los pozos están recubiertas con Estreptavidina empacados en una bolsa de papel de aluminio resellable.
- **Solución de parada:** 1 botella con 15 mL de ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar cualquier contacto con la piel). Lista para su uso.
- **Conjugado:** 1 botella con 12 mL de conjugado con peroxidasa de rabano (HRP) y anti LH biotinilado. contiene < 0,06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1), BSA 0,1 %.
- **Solución de sustrato TMB:** 1 botella con 15 mL de 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (H₂O₂-TMB 0,26 g/L) (evitar cualquier contacto con la piel); contiene < 0,0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **Solución de lavado concentrada 50x:** 1 botella con 20 mL NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L; contiene < 0,06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1), BSA 1 %.
- **Control:** 1 botella con 1 mL de una solución específica para el lote de control. La concentración se indica en la etiqueta de la botella; contiene < 0,06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1), BSA 1 %.

- **Estándares:** 6 botellas, de 1 mL cada una; contiene < 0,06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1), BSA 1 % y tienen aproximadamente las siguientes concentraciones:

Estándar 0:	0 mIU/mL
Estándar 1:	5 mIU/mL
Estándar 2:	25 mIU/mL
Estándar 3:	50 mIU/mL
Estándar 4:	100 mIU/mL
Estándar 5:	200 mIU/mL

Para indicaciones de peligro y consejos de prudencia consulte el cap.13.1.

4.2. Materiales suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 Instrucciones de uso

4.3. Materiales y equipos necesarios

- Lector de ELISA equipado para medir absorbancia a 450 nm, 620-630 nm.
- Pipetas para volúmenes 50 µL (precisión superior a 1,5%)
- Pipetas repetidoras para volúmenes 0.100 mL y 0.300 mL con una precisión superior a 1,5%
- Equipo manual o automático para el lavado de los pozos
- Agua destilada
- Papel absorbente para secar los pozos de la microplaca
- Temporizador
- Material para control de calidad

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacenan a 2...8 °C en oscuridad.

6. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

¡Es muy importante tener todos los reactivos, muestras, controles y estándares a temperatura ambiente (22...28 °C) durante al menos 30 minutos antes de iniciar la ejecución de la prueba! ¡Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2 – 8° C para evitar largos periodos a temperatura ambiente!

6.1. Placa de Microtitulación

Las tiras vienen listas para ser usadas y se rompen para separar los pozos. Están recubiertas con Estreptavidina. *Inmediatamente después de retirar las tiras que va a utilizar, asegúrese de guardar las tiras que no van a ser usados dentro de la bolsa de aluminio resellable junto con el desecante suministrado y almacenarla a una temperatura entre 2...8 °C.*

6.2. Conjugado

El conjugado viene listo para su uso.

6.3. Control

La botella contiene 1 mL de una solución de control específica para el lote. La concentración se indica en la etiqueta. Antes de utilizar, mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos. El control está listo para su uso.

6.4. Estándares

Antes de utilizar, mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos. Los estándares vienen listos para su uso. Una vez abiertos, los estándares permanecen estables 6 meses conservados a 2-8 °C.

6.5. Solución de sustrato TMB

El frasco contiene 15 mL de un sistema de tetrametilbencidina/peróxido de hidrógeno. El reactivo está listo para ser usado y debe ser almacenado a 2...8 °C en oscuridad. *La solución debe estar incolora o puede tener un ligero tinte azul. Si el sustrato se torna azul, esto indica que puede haberse contaminado y por lo tanto debe desecharse.*

6.6. Solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de "Solución de lavado conc. 50X" con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Para volúmenes más pequeños, asegúrese de respetar una relación de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2÷8 °C durante al menos 30 días.

7. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- La determinación de LH se puede realizar en el plasma, así como en el suero. Deben tenerse las precauciones habituales para la toma de muestras por punción venosa.
- Obtener las muestras de suero por la mañana y en ayunas para una comparación precisa que permita establecer valores normales.
- Para el suero, la sangre se debe recoger en un tubo de extracción por vía venosa, sin aditivos ni anticoagulantes; dejar que la sangre se coagule;
- Centrifugar las muestras para separar el suero de las células.

- Las muestras pueden conservarse a una temperatura de 2-8 °C durante un período máximo de 5 días. Si no se van a usar en este período, pueden conservarse a una temperatura de -20°C durante 30 días como máximo.
- No volver a congelar las muestras una vez descongeladas.
- Si el ensayo se realiza por duplicado, se requieren 40 µL de la muestra.

7.1. Precauciones

- La máxima precisión es necesaria al momento de dispensar los reactivos
- Este método permite determinar concentraciones de LH de 5 mIU/mL a 200 mIU/mL
- Para muestras con una concentración superior a 200 mIU/mL, diluir la muestra con el estándar 0.

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Preparación para la prueba

Por favor, lea detenidamente las instrucciones de uso **antes** de realizar el ensayo. La confiabilidad de los resultados depende del seguimiento estricto del protocolo de la prueba tal cual se describe en las instrucciones de uso. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles. Seleccione el número necesario de tiras de microtitulación o pozos e insértelos en el soporte. Por favor asigne por lo menos:

1 pozo (por ejemplo, A1)	para el blanco
2 pozos (por ejemplo, B1+C1)	para el estándar 0
2 pozos (por ejemplo, D1+E1)	para el estándar 1
2 pozos (por ejemplo, F1+G1)	para el estándar 2
2 pozos (por ejemplo, H1+A2)	para el estándar 3
2 pozos (por ejemplo, B2+C2)	para el estándar 4
2 pozos (por ejemplo, D2+E2)	para el estándar 5
2 pozos (por ejemplo, F2+G2)	para el control

Se recomienda determinar los estándares y muestras por duplicado.

Realice todos los pasos del ensayo en el orden indicado y sin retrasos apreciables entre los pasos.

Debe usar una punta desechable limpia para la dosificación de cada estándar y cada muestra del paciente.

- Agregue 20 µL de estándares, controles y muestras en sus respectivos pozos. Agregue 100 µL de conjugado a cada pozo. Deje el pozo A1 libre para el blanco del sustrato.
- Cubrir los pozos con la lámina autoadhesiva suministrada en el kit.
- Incube durante 1 hora a temperatura ambiente (22...28 °C).**
- Cuando se complete el tiempo de incubación, remover la lámina autoadhesiva suministrada, aspire el contenido de los pozos y lave cada pozo tres veces con 300 µL de solución de lavado diluida. Evite desbordamientos entre los pozos de reacción.

Nota importante: Agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.

Lavados automático: Si está utilizando una lavadora automática, hacer 5 lavados.

Nota: ¡El lavado es crítico! Un lavado insuficiente resulta en una mala precisión y valores de absorbancia falsamente elevados.

- Agregue 100 µL de solución de sustrato TMB en todos los pozos.
- Incube durante exactamente 15 minutos a temperatura ambiente (22...28 °C) en oscuridad.**
- Agregue 100 µL de solución de parada en todos los pozos en el mismo orden y a la misma velocidad que agregó la solución de sustrato TMB. Agite la microplaca. *Cualquier color azul desarrollado durante la incubación se convertirá en amarillo.*
- Leer la absorbancia a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.

9. CONTROL DE CALIDAD

Las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) requieren el uso de muestras de control de calidad en cada serie de ensayos para comprobar el rendimiento del ensayo. Los controles deberán tratarse como muestras desconocidas y los resultados deberán analizarse con métodos estadísticos adecuados.

El control incluido en el kit deberá ser probado como desconocidos y están destinados a ayudar a evaluar la validez de los resultados obtenidos con cada placa de ensayo.

Recomendamos a los usuarios mantengan registros gráficos de los valores de control que se generan con cada ensayo, incluida la media de ejecución, la DE (desviación estándar) y el % CV. Esta información facilitará los ensayos de tendencia de los controles relacionados con el rendimiento de lotes de control actuales e históricos relativos a los datos de control de calidad proporcionados. La tendencia facilitará la identificación de los análisis que generan valores de control significativamente distintos de su intervalo medio.

Al interpretar los datos de control, los usuarios deberán tener en cuenta que este producto fue diseñado y desarrollado como un producto manual. El rango establecido en el *Certificate of Analysis (CoA)* de calidad deberá ser adecuado para los ensayos que se realizan manualmente y en estricto cumplimiento del procedimiento de ensayo anteriormente descrito. Los profesionales del control de la calidad reconocen que, como resultado de las diferencias en las condiciones y en las prácticas, siempre habrá variaciones entre laboratorios en los valores medios y en la precisión de las mediciones de control⁸.

10. RESULTADOS

10.1. Cálculo de los resultados

Hay disponibles diversos paquetes de software de reducción de datos que se pueden utilizar para generar el promedio de la curva de calibración y para calcular el promedio de las concentraciones de muestras y controles desconocidos. Es necesario un ajuste de curva logístico de 4 parámetros (4PL), **incluido el estándar 0**. No se recomiendan otros algoritmos de ajuste de curva. También se puede preparar una curva de calibración en papel semilogarítmico mediante el trazado de la absorbancia media en el eje Y frente a la concentración de analitos en el eje X. El estándar 0 debe incluirse en la curva de calibración. Lea el valor de absorbancia medio de cada muestra desconocida que se encuentra fuera de la curva.

Para que los resultados del ensayo se consideren válidos, los estándares y el control del kit deben ajustarse a las especificaciones detalladas en el certificado de análisis específico del lote.

Si un control está fuera de su rango especificado, los resultados de la prueba asociados no son válidos y se deben volver a realizar pruebas de las muestras.

10.2. Valores de referencia

Los intervalos de referencia se indican del siguiente modo:

	LH (mIU/mL)
HOMBRES:	0,7 – 7,4
MUJERES:	
Fase folicular	0,5 – 10,5
Fase ovulatoria	18,4 – 61,2
Fase lútea	0,5 – 10,5
Menopausia	8,2 – 40,8

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

11. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPEÑO

11.1. Precisión

Variación intraensayo

La Variación intraensayo se ha determinado replicando (20x) la medición de tres sueros de control distintos. La variación intraensayo es $\leq 9,21\%$.

Variación interensayo

La variación interensayo se ha determinado replicando (10x) la medición de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variación interensayo es $\leq 7,91\%$.

11.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en una muestra enriquecida con 5.63 – 11.25 – 22.5 – 45 – 90 mIU/mL de LH ha dado un valor medio (\pm DE) de $97,17\% \pm 4,00\%$.

La prueba de dilución conducta en tres muestras diluidas 2 - 4 - 8 - 16 veces con estándar 0 dio una media (\pm DE) de $99,13\% \pm 7,37\%$.

11.3. Especificidad

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

Sustancia	Reactividad cruzada
LH	100 %
HCG	0,007 %
Prolactin	N.D.
FSH	N.D.
TSH	N.D.

11.4. Sensibilidad Analítica

La concentración mínima de LH que puede distinguirse del estándar 0 cero es de 0,22 mIU/mL.

11.5. Correlación

El kit LH se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 36 muestras de suero.

La curva de regresión es:

$$LH = 0,91 * (\text{ensayo comercial}) + 0,05$$

$$r^2 = 0,971$$

El kit LH (Y) se ha comparado con el kit LH del método anterior (X). Se probaron 36 muestras de suero.

La curva de regresión es la siguiente:

$$Y = 1,08 * (X) - 1,22$$

$$r^2 = 0,981$$

11.6. Efecto "Hook"

Este método no afecta "Hook" se observó hasta 400 mIU/mL.

12. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La contaminación bacteriana por ciclos repetidos de congelación y descongelación de la muestra puede afectar los valores de absorbancia.
- La hormona LH es suprimida por los estrógenos, pero en mujeres que toman anticonceptivos orales, los niveles pueden ser bajos o normales. Dietas demasiado radicales y pérdidas de peso repentinas pueden reducir la concentración de gonadotropina. La hormona luteinizante depende de factores distintos de la homeostasis pituitaria. Por lo tanto, limitarse a una determinación no es suficiente para realizar una estimación del estado clínico.
- Como en cualquier procedimiento diagnóstico, los resultados se deberán interpretar junto con los hallazgos clínicos del paciente y otra información de la que el médico disponga.
- Las características de rendimiento de este análisis no se han establecido para una población pediátrica.
- Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden presentar reacciones con las inmunoglobulinas reactivas, que interfieren con los inmunoensayos *in vitro*⁹. Los pacientes que se exponen habitualmente a animales o a productos de suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y puede que se observen valores anómalos.

13. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- El procedimiento de prueba, la información, precauciones y advertencias contenidas en las instrucciones de uso deben ser seguidas estrictamente. El uso de los kits con analizadores y equipos similares debe ser validado. No está autorizado realizar ningún cambio en el diseño, composición y procedimiento del ensayo, así como ningún uso en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario es responsable de tales cambios. El fabricante no se hace responsable por resultados falsos o por cualquier incidente causado por esta razón. El fabricante no se responsabiliza por los resultados obtenidos mediante el análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Sólo para uso en diagnóstico *in vitro* y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Todos los componentes de origen humano utilizados para la producción de estos reactivos han sido examinados para determinar la presencia de anticuerpos anti-VIH, anticuerpos anti-HCV y anticuerpos anti-HBsAg y se ha determinado que no son reactivos. Sin embargo, todo el material debe ser considerado y tratado como potencialmente infeccioso.
- No intercambiar reactivos o tiras de diferentes lotes de producción.
- No se deben utilizar reactivos de otros fabricantes en combinación con los reactivos de este kit.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Use sólo puntas para micropipeta, dispensadores y material de laboratorio limpio.
- No intercambie las tapas de los viales. Esto evita la contaminación cruzada.
- Cierre los viales de los reactivos con fuerza inmediatamente después de usarlos para evitar la evaporación y contaminación microbiana.
- Después de abrir el kit por primera vez y almacenarlo, verifique que los viales del conjugado y los estándares no presenten contaminación microbiana antes de continuar usándolo.
- No se deben usar en el ensayo muestras contaminadas microbiológicamente, muy lipémicas, ictericas o hemolizadas.
- Realizar la lectura verticalmente. No toque el fondo de los pozos.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pozo se mantiene constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debe prolongarse más de diez minutos para evitar la deriva del análisis. Si hay más de 10 minutos son necesarios, siga el mismo orden de dispensación. Si más de una placa se utiliza, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta en cada placa.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo.
Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados de ELISA, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Algunos reactivos (estándares, controles, conjugado y solución de lavado) contienen pequeñas cantidades de CMIT/MIT como conservante. Evite el contacto con la piel o mucosas.
- El sustrato TMB contiene un irritante, el cual puede ser perjudicial si es inhalado, ingerido o absorbido a través de la piel. Para prevenir daños, evite la inhalación, ingestión o contacto con la piel y ojos.
- La solución STOP consiste en una solución de ácido sulfúrico diluida. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo y puede ser tóxico si es ingerido. Para prevenir quemaduras con el químico, evite el contacto con la piel y los ojos.
- Además de la solución de sustrato TMB inicia una reacción cinética, que es terminada por la adición de la solución de parada. Por lo tanto, el sustrato TMB y la solución de parada debe ser añadido en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
- Evite la exposición del sustrato TMB a la luz solar directa, metal u oxidantes. No congelar la solución.
- Para prevenir la contaminación cruzada y la obtención de resultados falsamente elevados, pipetee las muestras de los pacientes y dispense el conjugado con exactitud hacia el fondo de los pozos evitando que se produzcan salpicaduras.
- La ELISA esta solamente diseñada para personal calificado que esté familiarizados con las buenas prácticas de laboratorio.

13.1. Nota de seguridad para los reactivos que contienen sustancias peligrosas

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) (consulte el cap. Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.)
Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

Atención



H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
P261	Evitar respirar el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.
P272	Se debe prohibir el uso de ropa de trabajo contaminada fuera del lugar de trabajo
P280	Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua.
P333+P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

Se puede encontrar más información en la ficha de datos de seguridad.

13.2. Consideraciones de Eliminación

Residuos de químicos y preparaciones generalmente se consideran como desechos peligrosos. La eliminación de esta clase de desechos está regulada mediante leyes y regulaciones nacionales y regionales. Contactar a sus autoridades locales o compañías de manejo de desechos que den asesoría en como dispones los residuos peligrosos.

Para obtener información sobre los materiales de embalaje, consulte MATERIALES DE EMBALAJE.

14. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

REF

DNOV030

LH

(96 Determinaciones)


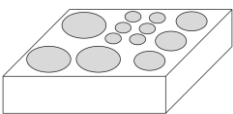


BIBLIOGRAPHY / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA

1. Kosasa T.S., "Measurement of Human Luteinizing Hormone." *Journal of Reproductive Medicine*, 26 (1981) pg. 201-6.
2. Danzer H., Braunstein G.D., et al., "Maternal Serum Human Chorionic Gonadotropic Concentrations and Fetal Sex Predictions." *Fertility and Sterility*, 34 (1980) pg. 336-40.
3. Braunstein G.D., et al., "Serum Human Luteinizing Hormone Levels through Normal Pregnancy ", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 126 (1976) pg. 678-81.
4. Goldstein D.P., and Kosasa T.S., "The Subunit Radioimmunoassay for LH Clinical Application." *Gynecology*, 6 (1975) pg. 145-84.
5. Batzer F., "Hormonal Evaluation of Early Pregnancy", *Fertility and Sterility*, 34 (1980) pg. 1-12.
6. Braunstein, G.D., et al., "First-Trimester Luteinizing Hormone Measurements as an Aid to the Diagnosis of Early Pregnancy Disorders", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 131 (1978) pg. 25-32.
7. Lenton E., Neal L. and Sulaiman R., "Plasma Concentrations of Human Gonadotropin from the time of Implantation until the Second Week of Pregnancy ", *Fertility and Sterility*, 37 (1982) pg. 773-78.
8. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
9. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27–33







ABBREVIATIONS / ABRÉVIATIONS / ABREVIACIONES

CMIT	5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one
MIT	2-methyl-2H-isothiazol-3-one

PACKAGING MATERIALS / MATERIELS D'EMBALLAGE / MATERIALES DE EMBALAJE

 <p>PAP 21</p>	 <p>PAP 21</p>	 <p>PAP 22</p>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">MTP</div>
			 <p>ALU / LDPE 90</p>

SYMBOLS KEY / EXPLICATION DES SYMBOLES / SIMBOLOS

	Manufactured by / Fabriqué par/ Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro
LOT	Lot Number/ Numéro de lot/ Número de lote
	Expiration Date/ Date de péremption/ Fecha de caducidad
	Storage Temperature/ Température de conservation/ Temperatura de almacenamiento
	Keep away from sunlight /Protéger de rayonnement solaire / Mantener alejado de la luz solar
CE	CE Mark/ Marquage CE / Marca CE
UDI	Unique Device Identifier / identification unique des dispositifs / identificación única del producto
REF	Catalogue Number / Référence du catalogue/ Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use/ Consulter la notice d'utilisation/ Consulte las Instrucciones de Uso
MTP	Microplate / Microplaque/ Microplaca
CONJ	Conjugate/ Conjugué/ Conjugado
CONTROL	Control/ contrôle / control
CAL	Calibrator resp. Standard/ Calibrateur resp. Etalon / Calibrador o bien Estándar
SOLN STOP	Stop solution / Solution d'arrêt / Solución de Parada
SUB TMB	TMB Substrate Solution / Solution de Substrat TMB / Solución Substrato TMB
WASH BUF 50x	Washing solution 50x concentrated / Solution de lavage concentré 50 x / solución de lavado concentrado x50
	Contains sufficient for "n" tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenido suficiente para "n" tests

SUMMARY OF TEST PROCEDURE / RÉSUMÉ DE LA PROCEDURE DE TEST / RESUMEN DE LA TÉCNICA

SCHEME OF THE ASSAY

LH

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
 Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls.
 Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate blank	Standard 0 - 5	Control	Sample
Standard 0 - 5	-	20 µL	-	-
Control	-	-	20 µL	-
Sample	-	-	-	20 µL
Conjugate	-	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for 1 h at room temperature (+22 - +28 °C) Wash each well three times with 300 µL diluted wash solution In case you use automatic equipment, wash the wells at least 5 times				
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark				
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently Photometric measurement at 450 nm, 620-630 nm				



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6
 63128 Dietzenbach, Germany
 Tel.: +49 6074 23698-0
 Fax: +49 6074 23698-900
 E-Mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com
 Website: clinical.goldstandarddiagnostics.com

Date of issue: 2025-07-29
 DNOV030_LH_IFU_rev02_fromLot_6262D