



DCM009-13

Ed. 03/2024

LH ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta dell'ormone luteinizzante (LH) nel siero o plasma umano

IVD

LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C

 $\Sigma = 96$ test

REF DKO009

1. SCOPO PREVISTO

Per uso diagnostico *in vitro*

Per uso professionale in laboratorio

Il dosaggio LH ELISA è un dispositivo diagnostico manuale *in vitro* destinato alla determinazione dell'ormone luteinizzante (LH) nel siero o plasma umano nel siero o nel plasma umano da una popolazione adulta.

2. SIGNIFICATO CLINICO

L'Ormone Luteinizzante (LH) è una glicoproteina composta da subunità di peso molecolare di circa 30,000 daltons. La subunità α è simile quella degli altri ormoni pituitari [ormone follicolo-stimolante (FSH), ormone stimolante la tiroide (TSH) e gonadotropina corionica (HGC)] mentre la subunità β è unica. Essa conferisce alla molecola l'attività biologica.

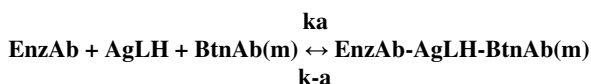
La subunità α consiste di 89 residui aminoacidici, mentre la subunità β contiene 129 aminoacidi. Il contenuto in carboidrati varia dal 15% al 30%. L'utilità clinica della determinazione dell'ormone luteinizzante (LH) nell'accertamento dell'omeostasi della regolazione della fertilità via asse ipotalamico-pituitario-gonadico è stata largamente dimostrata^{1,2}. Inoltre, la comparsa delle tecnologie relative alla fecondazione *in vitro* (IVF) volte alla risoluzione dei problemi di infertilità ha conferito un'ulteriore spinta al rapido sviluppo delle metodologie di determinazione dell'LH: dal saggio biologico tecnicamente complesso³ al saggio più semplice e rapido di tipo immunoenzimatico.

3. PRINCIPIO DEL METODO

In questo metodo calibratori, i campioni e/o controlli (contenenti l'antigene LH nativo), sono aggiunti nei pozzetti della micropiastra sensibilizzati con streptavidina. Successivamente, nei pozzetti sono aggiunti in eccesso sia anticorpi anti-LH monoclonali biotinilati sia anticorpi coniugati all'enzima; entrambi i tipi di anticorpi sono ad alta affinità e specificità e riconoscono epitopi diversi.

Nei pozzetti della micropiastra, la reazione tra l'antigene nativo e gli anticorpi avviene senza competizione o impedimento sterico, e si forma un complesso *sandwich* solubile.

L'interazione è illustrata dalla seguente equazione:



BtnAb(m) = anticorpo biotinilato monoclonale (in eccesso)

AgLH = antigene nativo (quantità variabile)

EnzAb = anticorpo marcato con enzima (in eccesso)

EnzAb-AgLH-BtnAb(m) = complesso sandwich antigene-anticorpi

k_a = costante di associazione

$k-a$ = costante di dissociazione

Contemporaneamente, il complesso viene depositato sul pozzetto mediante la reazione ad alta affinità tra la streptavidina e l'anticorpo biotinilato. Tale interazione è illustrata qui sotto:

EnzAb-AgLH-BtnAb(m) + Streptavidina C.W. $\Rightarrow$ complesso immobilizzato

Streptavidina C.W. = Streptavidina immobilizzata sul pozzetto

Complesso immobilizzato = Legame sandwich Anticorpo-Antigene legato alla superficie

Una volta raggiunto l'equilibrio, la frazione legata dell'anticorpo si separa dall'antigene non reagito mediante un lavaggio. L'attività enzimatica nella frazione legata all'anticorpo è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nativo libero. L'attività dell'enzima è quantificata mediante la reazione con un substrato che produce una colorazione. Utilizzando diversi calibratori a concentrazione nota di antigene, è possibile tracciare una curva dose-risposta, da cui si può determinare la concentrazione incognita dell'antigene.

4. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

4.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

ProClin >0,0015%, BSA 1%

CAL0

CAL1

CAL2

CAL3

CAL4

CAL5

REF DCE002/0906-0

REF DCE002/0907-0

REF DCE002/0908-0

REF DCE002/0909-0

REF DCE002/0910-0

REF DCE002/0911-0

2. Controlli (1 flacone, 1, mL ciascuno)

La concentrazione dei controlli è indicata sul certificato di analisi. ProClin >0,0015%, BSA 1%

REF DCE045/0903-0

3. Conjugate (1 flacone, 12 mL)

Anticorpi anti LH coniugato a Perossidasi di rafano (HRP) e anti LH biotinilato. ProClin >0,0015%

REF DCE002/0902-0

4. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)
Streptavidin adsorbed on microplate
REF DCE002/09203-0
5. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)
H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (*evitare il contatto con la pelle*),
ProClin <0,0015% **REF DCE004-0**
6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)
Acido solforico 0,15M (*evitare il contatto con la pelle*)
REF DCE005-0
7. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)
NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L, contains ProClin >0.015%
REF DCE006-0

4.2. Materiali richiesti ma non forniti

Acqua distillata

4.3. Materiali e strumentazione ausiliari

Erogatore automatico

Pipette di precisione

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

5. AVVERTENZE

- Questo kit è destinato all'uso *in vitro* esclusivamente da parte di professionisti. Non per uso interno o esterno in esseri umani o animali.
- Utilizzare adeguati dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le buone prassi di laboratorio (GLP, Good Laboratory Practice) per la manipolazione di emoderivati.
-  Il materiale di origine animale utilizzato nella preparazione del kit è stato ottenuto da animali certificati come sani e la proteina bovina è stata ottenuta da Paesi non infettati dalla BSE, ma tali materiali devono essere trattati come potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti (calibratori, controlli, coniugato e soluzione di lavaggio) contengono piccole quantità di ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) come conservante. Evitare il contatto con pelle o mucose.
- Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]

Sensibilizzazione cutanea, categoria 1



Attenzione

Contiene: ProClin 300

Indicazioni di pericolo:

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P261 - Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi / proteggere gli occhi / proteggere il viso / proteggere l'udito.

P321 - Trattamento specifico (vedere istruzioni supplementari di pronto soccorso su questa etichetta).

P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: Consultare un medico.

P362+P364 - Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.

- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

6. PRECAUZIONI

- Attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi di pipettaggio forniti in questo protocollo. I dati sulle prestazioni qui rappresentati sono stati ottenuti utilizzando i reagenti specifici elencati in queste istruzioni per l'uso.
- Tutti i reagenti devono essere conservati refrigerati a 2-8 °C nel contenitore originale. Tutte le eccezioni sono chiaramente indicate.
- Lasciare che tutti i componenti del kit e i campioni raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) e mescolare bene prima dell'uso.
- Non scambiare i componenti di kit di lotti diversi. La data di scadenza stampata sulle etichette della confezione e delle fiale deve essere rispettata. Non utilizzare alcun componente del kit dopo la data di scadenza.
- Se si utilizzano apparecchiature automatizzate, l'utente ha la responsabilità di assicurarsi che il kit sia stato adeguatamente convalidato per il suo utilizzo/scopo previsto.
- La rimozione incompleta o imprecisa del liquido dai pozzetti potrebbe influenzare la precisione del dosaggio e/o aumentare il background. Per migliorare le prestazioni del kit sui sistemi automatici, si raccomanda di aumentare il numero di lavaggi.
- È importante che il tempo di reazione in ogni pozzetto sia mantenuto costante per ottenere risultati riproducibili. Il pipettaggio dei campioni non deve andare oltre i dieci minuti per evitare deviazioni del dosaggio. Se sono necessari più di 10 minuti, seguire lo stesso ordine di erogazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva dose-risposta in ogni piastra.
- L'aggiunta della soluzione di substrato TMB avvia una reazione cinetica, che viene terminata dall'aggiunta della soluzione di arresto. Pertanto, il substrato TMB e la soluzione di arresto devono essere aggiunti nella stessa sequenza per eliminare qualsiasi deviazione temporale durante la reazione.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori medici analizzando i controlli e/o i sieri in pool.
- La massima precisione è richiesta per la ricostituzione e l'erogazione dei reagenti.
- I campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici, itterici o emolizzati non devono essere utilizzati nel dosaggio.
- I lettori di piastre misurano verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.
- Quando si pipettano i reagenti del dosaggio, compresi campioni, calibratori e controlli, è necessario utilizzare puntali monouso nuovi per ridurre il rischio di contaminazione da carryover. In caso contrario, i risultati potrebbero non essere validi.

7. CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Conservare il kit a 2-8 °C, al buio.

- Il kit è stabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta esterna del kit.
- Una volta aperto, i calibratori sono stabile a 2-8 °C per 6 mesi.
- La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 30 giorni a 2-8 °C.

Nota importante: aprire il sacchetto contenente la micropiastra rivestita solo quando è a temperatura ambiente e chiuderlo immediatamente dopo l'uso.

8. RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio deve essere effettuato su campioni di siero o plasma.

Conservazione dei campioni	Durata
2-8 °C	5 giorni
Cicli di congelamento/scongelamento	1 ciclo

9. PROCEDURA

9.1. Preparazione di calibratori e controlli

Prima dell'uso, miscelare delicatamente per 5 minuti con un miscelatore a rotazione. I Calibratori sono pronti all'uso, sono calibrati contro il riferimento internazionale WHO 1st IRP 68/40 ed hanno le seguenti concentrazioni:

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

I controlli sono pronti per l'uso; la concentrazione del controllo è stampata sull'etichetta.

9.2. Preparazione del coniugato

Pronto all'uso. Miscelare delicatamente per 5 minuti in un mixer a rotazione.

9.3. Preparazione della soluzione di lavaggio

Diluire il contenuto della fiala "Soluzione di lavaggio conc. 50X" con acqua distillata fino a un volume finale di 1000 mL prima dell'uso. Per i volumi più piccoli, rispettare il rapporto di diluizione 1:50.

È possibile osservare la presenza di cristalli all'interno della soluzione di lavaggio concentrata; in tal caso, mescolare a temperatura ambiente fino alla completa dissoluzione dei cristalli. Per una maggiore precisione, diluire l'intero flacone di soluzione di lavaggio concentrata a 1000 mL, avendo cura anche di trasferire completamente i cristalli sciaccquando il flacone, quindi mescolare fino a quando i cristalli non si dissolvono completamente.

9.4. Preparazione dei campioni

La determinazione dell'LH può essere eseguita in campioni di siero o plasma umano.

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

Raccogliere il sangue mediante puntura venosa in contenitori vacutainer e separare il siero (dopo la formazione del coagulo) o il plasma dalle cellule mediante centrifugazione.

Conservare il campione a -20 °C se la determinazione non viene eseguita lo stesso giorno della raccolta del campione. Prima dell'uso, miscelare delicatamente per 5 minuti con un miscelatore a rotazione.

9.5. Procedura

- **Lasciare che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) per almeno 30 minuti.** Alla fine del dosaggio, conservare immediatamente i reagenti a 2-8 °C: evitare una lunga esposizione a temperatura ambiente.
- Le strisce di micropozzetti rivestiti non utilizzate devono essere rilasciate in modo sicuro nella busta di alluminio contenente l'essiccante e conservate a 2-8 °C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche, i reagenti inutilizzati non devono mai essere trasferiti nelle fiale originali.
- Poiché è necessario eseguire la determinazione in duplicato per migliorare la precisione dei risultati del test, preparare due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni controllo, due per ogni campione, uno per il bianco.

Reagente	Calibratore	Campione/ Controlli	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₅	20 µL		
Campione / Controlli		20 µL	
Coniugato	100 µL	100 µL	
Incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (22 – 28 °C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita. Nota importante: durante ogni fase di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e rimuovere la soluzione in eccesso picchiettando la piastra capovolta su un tovagliolo di carta assorbente. Lavatore automatico: se si utilizzano apparecchiature automatiche, lavare i pozzetti almeno 5 volte.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare per 15 minuti, al buio, a temperatura ambiente (22-28 °C).			
Soluzione di arresto	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm o contro il bianco entro 5 minuti.			

10. CONTROLLO QUALITÀ

Le buone prassi di laboratorio (GLP) richiedono l'inclusione di campioni per il controllo della qualità in ogni serie di dosaggi al fine di verificare le prestazioni del dosaggio. I controlli devono essere trattati come campioni sconosciuti e i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati.

I controlli forniti nel kit devono essere testati come se fossero sconosciuti e hanno lo scopo di agevolare la valutazione della validità dei risultati ottenuti in ogni piastra di dosaggio.

La concentrazione media di ciascun livello di controllo è documentata nel rapporto del controllo di qualità incluso in ciascun kit. Tali livelli di concentrazione media sono

determinati in base a diversi dosaggi eseguiti in duplicato in più posizioni su ciascuna piastra.

DiaMetra raccomanda agli utenti di conservare le annotazioni grafiche dei valori di controllo generati con ciascun dosaggio, tra cui medie mobili, DS e % CV. Queste informazioni faciliteranno l'analisi delle tendenze dei controlli per quanto riguarda le prestazioni dei lotti di controllo attuali e pregressi rispetto ai dati forniti nel controllo di qualità. Le tendenze aiuteranno a identificare i dosaggi che generano valori di controllo significativamente diversi dal rispettivo intervallo medio.

Quando si interpretano i dati dei controlli, occorre tenere conto del fatto che il prodotto è stato progettato e sviluppato come prodotto per l'utilizzo manuale. L'intervallo riportato sul certificato di controllo di qualità deve essere appropriato per i dosaggi eseguiti manualmente e rispettando rigorosamente la procedura di dosaggio descritta sopra. Gli esperti del controllo di qualità riconoscono che, a causa delle differenze di condizioni e di prassi, si avrà sempre una variabilità nei valori medi e nella precisione delle misurazioni dei controlli eseguite da laboratori diversi⁸.

11. CALCOLO DEI RISULTATI

Sono disponibili vari pacchetti software di elaborazione dei dati, che possono essere utilizzati per generare la curva di calibrazione media e per calcolare le concentrazioni medie di campioni e controlli sconosciuti. È necessario un adattamento della curva logistica a 4 parametri (4PL) **che include il calibratore 0**. Gli altri algoritmi di adattamento della curva non sono raccomandati.

In alternativa, è possibile preparare una curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica tracciando un grafico con l'assorbanza media sull'asse delle ordinate e la concentrazione dell'analita sull'asse delle ascisse. Nella curva di calibrazione deve essere incluso il calibratore 0. Leggere il valore medio dell'assorbanza di ciascun campione sconosciuto dalla curva.

Affinché i risultati del dosaggio siano considerati validi, i calibratori e i controlli del kit devono rientrare nelle specifiche riportate nel certificato di analisi specifico del lotto.

In caso contrario, i risultati dei test associati non saranno validi e i campioni dovranno essere analizzati nuovamente.

12. VALORI ATTESI

Gli intervalli di riferimento sono riportati come segue

	LH (mIU/mL)
Maschi	0.7 – 7.4
FEMMINE	
Fase follicolare	0.5 – 10.5
Fase Ovulatoria	18.4 – 61.2
Fase luteinica	0.5 – 10.5
Menopausa	8.2 – 40.8

Gli intervalli sopraindicati devono essere considerati solo come linee guida; si raccomanda a ogni laboratorio di stabilire i propri intervalli di valori attesi sulla base della propria popolazione di pazienti.

13. CARATTERISTICHE DI AZIONE

Sono mostrati i dati più rappresentativi delle prestazioni. I risultati ottenuti nei singoli laboratori possono variare.

13.1. Precisione

13.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso dosaggio è stata determinata replicando (20x) la misura di tre differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è ≤ 9,21%.

13.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra dosaggi differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è ≤ 7,91%.

13.2. Correlazione

Il kit LH ELISA è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 36 campioni di siero. La curva di regressione è:

n	Pendenza	Intercetta (mIU/mL)	R ²
36	0,91	0,05	0,971

Il nuovo kit LH ELISA Dia.Metra è stato comparato al vecchio kit LH ELISA Dia.Metra. Sono stati testati 36 campioni di siero.

La curva di regressione è:

n	Pendenza	Intercetta (mIU/mL)	R ²
36	1,08	-1,22	0,981

13.3. Sensibilità

La concentrazione minima misurabile di LH che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,22 mIU/mL.

13.4. Specificità

La cross-reattività del kit Dia.Metra LH verso le sostanze potenzialmente interferenti è stata stimata aggiungendo tali sostanze, a varie concentrazioni, ad una matrice di siero. La cross-reattività è stata calcolata mediante un rapporto fra dose di sostanza interferente e dose di Ormone Luteinizzante necessario per produrre la stessa OD.

Sostanza testata	Cross Reattività
LH	100 %
HCG	0,007 %
Prolactin	N.D.
FSH	N.D.
TSH	N.D.

13.5. Accuratezza

La prova di recupero condotta su tre differenti campioni arricchiti con 5,63 - 11,25 - 22,5 - 45 - 90 mIU/mL di LH, ha dato un valore medio (±SD) di 97,17% ± 4,00%.

Per la prova di diluizione sono stati diluiti 3 diversi campioni 2, 4, 8 e 16 volte con Calibratori 0; il valore medio (±SD) ottenuto è 99,13% ± 7,37%.

13.6. Effetto Hook

Il kit Dia.Metra LH non presenta effetto Hook fino a 400 mIU/mL.

14. LIMITAZIONI D'USO

- L'ormone LH viene soppresso dagli estrogeni, tuttavia nelle donne che assumono contraccettivi per via orale, i livelli possono risultare bassi o normali. Diete troppo radicali e perdite di peso repentine possono abbassare la concentrazione di gonadotropina. L'ormone luteinizzante dipende da fattori diversi dall'omeostasi pituitaria. Pertanto, limitarsi a una determinazione non è sufficiente per effettuare una stima dello status clinico.
- Come nel caso di qualsiasi procedura diagnostica, i risultati devono essere interpretati unitamente ai dati clinici del paziente e alle altre informazioni a disposizione del medico.
- Non sono state stabilite le caratteristiche di azione di questo dosaggio nella popolazione pediatrica.
- Gli anticorpi eterofili nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline dei reagenti, interferendo con gli immunodosaggi *in vitro*¹¹. I pazienti regolarmente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero animale possono essere soggetti a questa interferenza, quindi si potrebbero osservare valori anomali.

15. GESTIONE DEI RIFIUTI

I reagenti devono essere smaltiti in conformità alle normative locali.

Tutti i materiali che sono entrati in contatto con i campioni e i reagenti devono essere smaltiti in conformità con le normative nazionali, regionali e locali.

16. 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

17. IDENTIFICATORE DELLE REVISIONI

Le aggiunte o le modifiche alle istruzioni per l'uso sono indicate dall'evidenziazione in grigio.

18. RECLAMI SUI PRODOTTI E SUPPORTO TECNICO

Per un paziente/utente/terza parte nell'Unione Europea e nei Paesi con un regime normativo simile (Regolamento 2017/746/UE relativo ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*); se, durante l'uso di questo dispositivo o come risultato del suo utilizzo, si è verificato un incidente grave, segnalarlo al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità normativa nazionale.

Il produttore può essere contattato tramite il relativo servizio clienti o il team di supporto tecnico. I dettagli di contatto sono disponibili di seguito e sul sito Web dell'azienda: www.diametra.com.

Ed. 03/2024

DCM009-13



DCM009-13

Ed. 03/2024

LH ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of luteinising hormone (LH) in human serum or plasma

IVD

LOT

See external label

2°C  8°C $\Sigma = 96$ tests

REF DKO009

1. INTENDED PURPOSE

For *In Vitro* Diagnostic Use
For Laboratory Professional Use

LH ELISA is a manual *in vitro* diagnostic device intended for the quantitative determination of luteinising hormone (LH) in human serum or plasma from an adult population.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

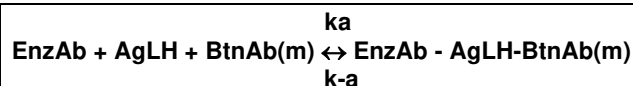
Luteinising hormone (LH) is a glycoprotein consisting of two subunits with a molecular mass of 30,000 Daltons. The α -subunit is similar to other pituitary hormones [follicle stimulating hormone (FSH), thyroid stimulating hormone (TSH) and chorionic gonadotropin (HCG)] while the β -subunit is unique. 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 luteinising 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* fertilisation (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.

3. PRINCIPLE OF THE METHOD

In this method, the LH calibrators, the patient specimens and/or the controls (containing the native antigen) are first added to streptavidin coated wells. Then monoclonal biotinylated 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. A 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 in the following equation:



BtnAb(m) = biotinylated monoclonal antibody (excess quantity)

AgLH = native antigen (variable quantity)

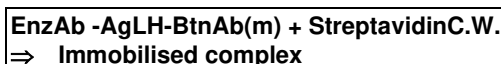
EnzAb = enzyme labeled antibody (excess quantity)

EnzAb-AgLH-BtnAb(m) = antigen-antibodies sandwich complex

k_a = 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 is illustrated below:



Streptavidin C.W. = streptavidin immobilised on well.

Immobilised complex = antibodies-antigen sandwich bound.

After equilibrium is attained, the antibody-bound fraction is separated from unbound antigen by a washing step. The enzyme activity in the antibody-bound fraction is directly proportional to the native antigen concentration. The activity of the enzyme present on the surface of the well quantitated by reaction with a suitable substrate to produce colour. By utilising 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. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

4.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

ProClin >0.0015%, BSA 1%

CAL0	REF DCE002/0906-0
CAL1	REF DCE002/0907-0
CAL2	REF DCE002/0908-0
CAL3	REF DCE002/0909-0
CAL4	REF DCE002/0910-0
CAL5	REF DCE002/0911-0

2. Control (1 vial, 1 mL)

Concentration of Control is indicated on the Certificate of Analysis. ProClin >0.0015%, BSA 1%

REF DCE045/0903-0

3. Conjugate (1 vial, 12 mL)

Anti- LH antibodies conjugated with horseradish peroxidase (HRP) and biotinylated anti- LH. ProClin >0.0015%, BSA 0.1%

REF DCE002/0902-0

4. Coated Microplate (1 microplate breakable)

Streptavidin adsorbed on microplate

REF DCE002/0903-0

5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

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

ProClin <0.0015% REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15M (avoid any skin contact)

REF DCE005-0

7. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L, contains ProClin >0.015%

REF DCE006-0

4.2. Materials required but not provided

Distilled water

4.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser

Precision Pipetting Devices

Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)

5. WARNINGS

- This kit is intended for *in vitro* use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
-  Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents (calibrators, control, conjugate and wash solution) contain small amounts of ProClin™ 300 (>0.0015%, <0.06%) as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.

- Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Skin sensitivity, Category 1



Warning

Contains: ProClin 300

Hazard statements:

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

P261 - Avoid breathing dust / fume / gas / mist / vapours / spray.

P280 - Wear protective gloves/ protective clothing / eye protection / face protection / hearing protection.

P321 - Specific treatment (see supplemental first aid instruction on this label).

P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362+P364 - Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous, corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to direct sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

6. PRECAUTIONS

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

- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- 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.
- Fresh disposable tips must be used when pipetting assay reagents including samples, calibrators and controls to mitigate the risk of carryover contamination. Failure to do so may lead to invalid results.

7. REAGENT STORAGE AND STABILITY

Store the kit at 2 – 8°C in the dark.

- The kit is stable at 2 – 8°C until the expiry date stated on the external kit label.
- Once opened, the calibrators are stable at 2 – 8°C for 6 months.
- The diluted wash solution is stable for 30 days at 2 – 8°C.

Important note: open the bag containing the Coated Microplate only when it is at room temperature and close it immediately after use.

8. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

The assay should be performed using serum or plasma samples.

Sample Storage	Duration
2 – 8 °C	5 days
Freeze/thaw cycles	1 cycle

9. PROCEDURE

9.1. Preparation of Calibrators and Controls

Before use, mix for 5 minutes with a rotating mixer. The Calibrators are ready to use, are calibrated against the international reference WHO 1st IRP 68/40 and have the following concentrations:

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

The control is ready to use; the concentration is printed on the label.

9.2. Preparation of the Conjugate

The conjugate is ready to use.

9.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the content of the vial “50X Conc. Wash Solution” with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio.

It is possible to observe the presence of crystals within the concentrated wash solution; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals. For greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated

wash solution to 1000 mL, taking care also to transfer crystals completely by rinsing of the bottle, then mix until crystals are completely dissolved.

9.4. Preparation of Samples

The determination of LH can be performed in human serum or plasma samples.

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

Collect blood by venepuncture into vacutainers and separate serum (after clot formation) or plasma from the cells by centrifugation.

Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. Before using, mix gently, for 5 minutes, with a roller mixer.

9.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22 – 28 °C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, immediately store the reagents at 2 – 8°C: avoiding long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2 – 8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for the Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	20 µL		
Sample/Control		20 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	

Incubate 1 h at room temperature +22 – 28°C. Remove the contents from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution.

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

Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.

TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Incubate at 22 – 28°C for 15 minutes in the dark.

Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Shake gently the microplate.
Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.

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

The mean concentration of each control level is documented in the QC report included with each kit. These mean concentration levels are determined over several assays which are run in duplicate in multiple locations across each plate.

DiaMetra recommends 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 QC certificate 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.

11. 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 Calibrator 0 is required**. 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. Calibrator 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 calibrators 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.

12. EXPECTED VALUES

Reference ranges are hereby reported:

	Expected values (mIU/mL)
Males	0.7 – 7.4
Females	
Follicular phase	0.5 – 10.5
Ovulation phase	18.4 – 61.2
Luteal phase	0.5 – 10.5
Postmenopausal	8.2 – 40.8

The above ranges should be considered as guidelines only; it is recommended that each laboratory establish its own expected range based upon its own patient population.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Representative performance data are shown. Results obtained at individual laboratories may vary.

13.1. Precision

13.1.1. Intra Assay Variation

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

13.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate (10x) the measurements of three different control sera in different lots. The between assay variability is $\leq 7.91\%$.

13.2. Method comparison

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

The regression curve is:

n	Slope	Intercept (mIU/mL)	R ²
36	0.91	0.05	0.971

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

The regression curve is:

n	Slope	Intercept (mIU/mL)	R ²
36	1.08	-1.22	0.981

13.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of LH that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.22 mIU/mL.

13.4. Specificity

The cross-reactivity of the LH ELISA 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 luteinising hormone needed to produce the same absorbance.

Substance tested	Cross Reactivity
LH	100 %
HCG	0.007 %
Prolactin	N.D.
FSH	N.D.
TSH	N.D.

13.5. 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 Calibrator 0; the average value ($\pm$ SD) obtained is 99.13% $\pm$ 7.37%.

13.6. Hook Effect

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

14. LIMITATIONS OF USE

- 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.

15. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed of in accordance with local regulations.

All materials that have come into contact with samples and reagents must be disposed of in accordance with country, state and local regulations.

16. BIBLIOGRAPHY

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

17. REVISION IDENTIFIER

Additions or changes to the IFU are indicated by grey highlighting.

18. PRODUCT COMPLAINTS AND TECHNICAL SUPPORT

For a patient/user/third party in the European Union and in countries with similar regulatory regime (Regulation 2017/746/EU on IVD Medical Devices); if, during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorised representative and to your national regulatory authority.

The manufacturer can be contacted through their customer service or technical support team. The contact details can be found below and on the company website: www.diametra.com.

Ed. 03/2024

DCM009-13



DCM009-13

Ed. 03/2024

LH ELISA

para el análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de la hormona luteinizante (LH) en suero o plasma humano

IVD

LOT

Ver etiqueta
externa2°C  8°C $\Sigma = 96$ pruebas

REF DKO009

1. FINALIDAD PREVISTA

Para uso en diagnóstico *in vitro*

Para uso profesional de laboratorio

El ensayo LH ELISA es un dispositivo manual de diagnóstico *in vitro* destinado a la determinación cuantitativa de la concentración de la hormona luteinizante (LH) en suero o plasma humano de una población adulta.

2. IMPORTANCIA CLÍNICA

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 hipotálamico-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.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

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 epítopos 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:

BtAb(m) = anticuerpo biotinilado monoclonal (en exceso)**AgLH** = antígeno nativo (cantidad variable)**EnzAb** = anticuerpo marcado con una enzima (en exceso)**EnzAb-AgLH-BtAb(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:

EnzAb-AgLH-BtAb(m) + estreptavidina C.W. $\Rightarrow$ complejo inmovilizado**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. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

4.1. Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (6 viales de 1 mL cada uno)

ProClin >0,0015% y BSA 1%

CAL0

CAL1

CAL2

CAL3

CAL4

CAL5

REF DCE002/0906-0

REF DCE002/0907-0

REF DCE002/0908-0

REF DCE002/0909-0

REF DCE002/0910-0

REF DCE002/0911-0

2. Control (1 viales de 1 mL)

La concentración de los controles se indica en el certificado de análisis

ProClin >0,0015% y BSA 1% **REF DCE045/0903-0**

3. Conjugado (1 vial, 12 mL)

Anticuerpos anti LH conjugado con peroxidasa de rabano (HRP) y anti LH biotinilado, ProClin >0,0015%

REF DCE002/0902-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca que se puede romper) Streptavidina absorbida en la microplaca

REF DCE002/0903-0

5. Sustrato de TMB (1 vial, 15 mL)

H₂O₂-TMB 0,26 g/L (evitar el contacto con la piel). ProClin <0,0015% **REF DCE004-0**

6. Solución de parada (1 vial, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 M (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

7. Conc. 50X Solución de lavado (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L, ProClin >0,0015%

REF DCE006-0

4.2. **Materiales necesarios pero no suministrados**

Agua destilada

4.3. **Materiales auxiliares e instrumentación**

Dispensador automático

Dispositivos de pipetas de precisión

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

5. **ADVERTENCIAS**

- Este kit está destinado al uso *in vitro* realizado exclusivamente por profesionales. No es para uso interno o externo en personas ni animales.
- Utilice el equipo de protección personal adecuado cuando trabaje con los reactivos suministrados.
- Siga las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) para manipular productos sanguíneos.
-  El material de origen animal utilizado en la preparación del kit se ha obtenido de animales certificados como sanos y la proteína bovina se ha obtenido de países donde no hay infección de EEB, pero estos materiales deben manejarse como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos (calibradores, control conjugado y solución de lavado) contienen pequeñas cantidades de ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.
- Clasificación según Reglamento (UE) n° 1272/2008 [CLP]

Sensibilización cutánea, categoría 1



Atención

Contiene: ProClin 300

Indicaciones de peligro:

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia:

P261 - Evitar respirar el polvo / el humo / el gas / la niebla / los vapores / el aerosol.

P280 - Llevar guantes / ropa de protección / equipo de protección para los ojos / la cara / los oídos.

P321 - Se necesita un tratamiento específico (ver instrucciones de primeros auxilios en esta etiqueta).

P333+P313 - En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P362+P364 - Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

- La solución de detención consiste en una solución diluida de ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico es venenoso, corrosivo y puede ser tóxico si se ingiere. Para evitar quemaduras químicas, evite el contacto con la piel y los ojos.
- Evite la exposición del reactivo TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, a metales o a oxidantes. No congele la solución.

6. **PRECAUCIONES**

- Siga estrictamente la secuencia de pasos de pipeteado que se indica en este protocolo. Los datos de rendimiento representados en este documento se obtuvieron utilizando los reactivos específicos indicados en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse refrigerados entre 2 y 8 °C en su envase original. Las excepciones se indican claramente.
- Deje que todos los componentes del kit y las muestras alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) y mezcle bien antes de usarlos.
- No intercambie componentes del kit procedentes de diferentes lotes. Debe respetarse la fecha de caducidad impresa en las etiquetas de la caja y de los viales. No utilice ningún componente del kit después de su fecha de caducidad.
- Si el usuario utiliza un equipo automatizado, tiene la responsabilidad de asegurarse de que el kit ha sido debidamente validado para su uso previsto.
- La eliminación incompleta o imprecisa del líquido de los pocillos podría alterar la precisión del ensayo y/o aumentar el fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en sistemas automáticos se recomienda aumentar el número de lavados.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debe prolongarse más de diez minutos para evitar errores en el ensayo. Si se necesitan más de 10 minutos, siga el mismo orden de dispensación. Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta en cada placa.
- La adición de la solución de sustrato de TMB inicia una reacción cinética, que finaliza al añadir la solución de detención. Por lo tanto, el sustrato de TMB y la solución de detención deben añadirse en la misma secuencia para eliminar las posibles desviaciones temporales durante la reacción.
- Respete las directrices para realizar el control de calidad en los laboratorios médicos mediante el ensayo de controles y/o sueros combinados.
- Se requiere la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.

- No se deben usar en el ensayo muestras contaminadas microbiológicamente, muy lipémicas, **ictéricas** o hemolizadas.
- Los lectores de placas miden en vertical. No toque el fondo de los pocillos.
- Deben emplearse puntas desechables nuevas al pipetear reactivos de ensayo, incluidas las muestras, los calibradores y los controles, para mitigar el riesgo de contaminación por arrastre. De lo contrario, los resultados podrían no ser válidos.

7. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Almacene el kit a 2-8 °C en un lugar oscuro.

- El kit es estable a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta externa.
- Una vez abierto, los calibradores son estable a 2-8 °C durante 6 meses.
- La solución de lavado diluida es estable durante 30 días a 2-8 °C.

Nota importante: abra la bolsa que contiene la microplaca recubierta solo cuando esté a temperatura ambiente y ciérrela inmediatamente después de su uso.

8. RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El ensayo debe realizarse usando muestras de suero o plasma.

Almacenamiento de muestras	Duración
2-8 °C	5 días
Ciclos de congelación/descongelación	1 ciclo

9. PROCEDIMIENTO

9.1. Preparación de calibradores y controles

Antes de utilizar, mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

Los Calibradores son listos para usar, son calibrados frente al estándar internacional WHO 1st IRP 68/40 y tienen las siguientes concentraciones:

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

Los controles están listos para su uso; la concentración del control está impresa en la etiqueta.

9.2. Preparación del conjugado

El conjugado está listo para usar.

9.3. Preparación de la solución de lavado

Diluir el contenido del vial «50X Conc. Wash Solution» con agua destilada hasta un volumen final de 1000 mL antes de usarlo. Para volúmenes más pequeños, respete la relación de dilución de 1:50.

Es posible que observe la presencia de cristales dentro de la solución de lavado concentrada; en este caso, mezcle a temperatura ambiente hasta la completa disolución de los

cristales. Para una mayor precisión, diluya todo el frasco de solución de lavado concentrada a 1000 mL, teniendo cuidado también de transferir los cristales enjuagando completamente el frasco y luego mezclando hasta que los cristales se disuelvan completamente.

9.4. Preparación de las muestras

La determinación de LH se puede realizar en muestras de suero o plasma humano.

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

Recoja la sangre mediante venopunción en vacutainers y separe el suero (después de la formación del coágulo) o el plasma de las células mediante centrifugación.

Almacenar la muestra a -20 °C si la determinación no se lleva a cabo el mismo día que se recoge la muestra. Antes de utilizar, mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

9.5. Procedimiento

- **Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) durante al menos 30 minutos.** Al finalizar el ensayo, almacene inmediatamente los reactivos a 2-8 °C: evite la exposición prolongada a la temperatura ambiente.
- Las tiras de micropocillos recubiertas no utilizadas deben dejarse de forma segura en el envoltorio de papel de aluminio que contiene desecante y almacenarse a 2-8 °C.
- Para evitar que se produzca una posible contaminación microbiana y/o química, los reactivos no utilizados nunca se deberán transferir a los viales originales.
- Como es necesario realizar la determinación por duplicado para mejorar la precisión de los resultados de la prueba, prepare dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para el control, dos para cada muestra y uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/Controles	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₅	20 µL		
Muestra / Controles		20 µL	
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incube durante 1 hora a temperatura ambiente (22 – 28 °C). Retire el contenido de cada pocillo, lave los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.			
Nota importante: en cada paso de lavado, agite ligeramente la placa durante 5 segundos y elimine el exceso de solución golpeando la placa invertida sobre un paño de papel absorbente.			
Lavadora automática: si utiliza un equipo automático, lave los pocillos al menos 5 veces.			
Sustrato de TMB	100 µL	100 µL	100 µL

Incube durante 15 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente (22-28 °C).

Solución de detención	100 µL	100 µL	100 µL
-----------------------	--------	--------	--------

Agite suavemente la microplaca.
Compare la absorbancia (E) a 450 nm con la obtenida con una longitud de onda de referencia de 620-630 nm o con el blanco en un plazo de 5 minutos.

10. CONTROL DE CALIDAD

Las prácticas de laboratorio recomendadas (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.

Los controles incluidos en el kit deberán ser probados como desconocidos y están destinados a ayudar a evaluar la validez de los resultados obtenidos con cada placa de ensayo.

La concentración media de cada nivel de control se documenta en el informe de control de calidad que se incluye en cada kit. Los niveles de concentración media se determinan respecto de varios análisis, los cuales se realizan por duplicado en varios puntos diferentes de cada placa.

DiaMetra recomienda que 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 certificado de control 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 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 control¹⁸.

11. 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 calibrador 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 calibrador 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 calibradores 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.

12. VALORES ESPERADOS

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

Los rangos anteriores deberán ser considerados como directrices solamente; se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango previsto en función de su propia población de pacientes.

13. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se muestran los datos de rendimiento representativos. Los resultados obtenidos en diferentes laboratorios pueden diferir.

13.1. Precisión

13.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (20x) la medición de tres sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es $\leq 9.21\%$.

13.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es $\leq 7.91\%$.

13.2. Correlación

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

La curva de regresión es:

n	Pendiente	Intersección (mIU/mL)	R ²
36	0,91	0,05	0,971

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

La curva de regresión es la siguiente:

n	Pendiente	Intersección (mIU/mL)	R ²
36	1,08	-1,22	0,981

13.3. Sensibilidad

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

13.4. Especificidad

La reactividad cruzada del kit LH Dia.Metra 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.

13.5. 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 conductada en tres muestras diluidas 2 - 4 - 8 - 16 veces con Calibrador 0 dio una media ($\pm$ DE) de 99.13% $\pm$ 7.37%.

13.6. Efecto "Hook"

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

14. LÍMITES DE USO

- 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.

15. GESTIÓN DE RESIDUOS

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa local.

Todos los materiales que hayan entrado en contacto con las muestras y los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa nacional, estatal y local.

16. BIBLIOGRAFÍA

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

17. IDENTIFICADOR DE REVISIÓN

Las adiciones o cambios en las instrucciones de uso se han resaltado en gris.

Puede contactar con el fabricante a través del servicio de atención al cliente o del equipo de asistencia técnica. Los datos de contacto se encuentran a continuación y en el sitio web de la empresa: www.diametra.com.

18. RECLAMACIONES SOBRE PRODUCTOS Y ASISTENCIA TÉCNICA

Para un paciente/usuario/tercero en la Unión Europea y en países con un régimen regulatorio similar: Reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro; si, durante el uso de este dispositivo o como resultado de su uso, se ha producido un incidente grave, informe del mismo al fabricante y/o a su representante autorizado y al organismo regulador nacional.

Ed. 03/2024

DCM009-13

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