



DCM009-12
Ed. 09/2018

LH ELISA

per analisi di routine

Test per la determinazione immunoenzimatica diretta dell'ormone luteinizzante (LH) nel siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO009

DESTINAZIONE D'USO

Il kit Dia.Metra LH ELISA è un metodo immunoenzimatico in fase solida per la determinazione quantitativa dell'ormone luteinizzante (LH) nel siero o plasma umano.

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

1. 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 complesso (3) al saggio più semplice e rapido di tipo immunoenzimatico.

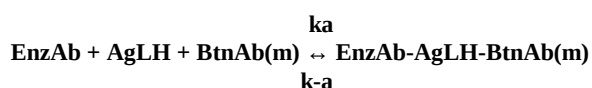
2. PRINCIPIO DEL METODO

Saggio immunoenzimatico.

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)

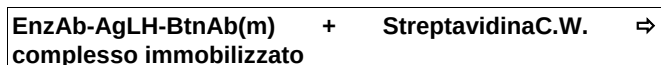
EnzAb = anticorpo marcato con enzima (in eccesso)

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:



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.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

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 flacone, 1 mL)

La concentrazione del Controllo è riportata sul Certificato di Analisi **REF DCE045/0903-0**

3. Conjugate (1 flacone, 12 mL)

Anticorpi anti LH coniugato a Perossidasi di rafano (HRP) e anti LH biotinilato **REF DCE002/0902-0**

4. Coated microplate (1 microplate breakable)

Streptavidina adsorbita nella micropiastra

REF DCE002/0903-0

5. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

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

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

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

REF DCE005-0

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

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L **REF DCE006-0**

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

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

Note

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

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

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300[®] come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di LH da 5 mIU/mL a 200 mIU/mL.

5. PRECAUZIONI

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

6. PROCEDIMENTO

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

I Calibratori sono pronti all'uso, sono calibrati contro 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

Per campioni con concentrazione superiore a 200 mIU/mL diluire il campione con il Calibratore 0. Dopo l'apertura, i Calibratori sono stabili 6 mesi a 2-8°C.

6.2. Preparazione della soluzione di lavaggio

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di soluzione di lavaggio tamponata concentrata (50X) con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2÷8°C per almeno 30 giorni.

6.3. Preparazione del campione

Utilizzare campioni di siero o plasma, e osservare le consuete precauzioni nella raccolta di campioni provenienti da prelievo per via venosa.

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

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

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

Se testati in duplicato, sono necessarie quantità di 0,040 mL dei campioni.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagenti	Calibratore	Campioni/ Controllo	Bianco
Campioni / Controllo		20 µL	
Calibratore C ₀ -C ₅	20 µL		
Coniugato	100 µL	100 µL	

Incubare 1 h a temperatura ambiente (22÷28°C).

Allontanare la miscela di reazione, lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di soluzione di lavaggio diluita.

Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente.

Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.

TMB Substrato	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22÷28°C), al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO DI QUALITÀ

Ogni laboratorio dovrebbe testare i controlli interni con livelli compresi nell'intervallo basso, normale ed alto della curva di calibrazione per monitorare le prestazioni del saggio. Questi controlli dovrebbero essere trattati come campioni incogniti e i valori determinati in ogni seduta.

Conservare i fogli di controllo qualità, per seguire le prestazioni dei reagenti forniti.

Dovrebbero inoltre essere utilizzati pertinenti metodi statistici per verificare l'andamento.

Deviazioni significative rispetto alle prestazioni stabilite possono indicare un inosservato cambio di condizioni sperimentali o una degradazione dei reagenti kit. Devono essere usati reagenti freschi per determinare la ragione delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione Media

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

8.2. Curva di calibrazione

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

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

8.3. Calcolo dei risultati

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

9. VALORI ATTESI

Gli intervalli di riferimento sono riportati 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

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

10. LIMITI DELLA PROCEDURA

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.

11. CARATTERISTICHE DEL SAGGIO

11.1. Precisione

11.1.1. 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 $\leq 9,21\%$.

11.1.2. 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 $\leq 7,91\%$.

11.2. Correlazione

Il kit LH ELISA Dia.Metra è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 36 campioni di siero.

La curva di regressione è:

$$\text{Dia.Metra} = 0,91 * (\text{commercial kit}) + 0,05$$

$$R \text{ quadro} = 0,971$$

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:

$$(\text{Dia.Metra new}) = 1,08 * (\text{Dia.Metra old}) - 1,22$$

$$R \text{ quadro} = 0,981$$

11.3. Sensibilità

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

11.4. 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.

11.5. 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 ($\pm$ SD) di $97,17\% \pm 4,00\%$. Per la prova di diluizione sono stati diluiti 3 diversi campioni 2, 4, 8 e 16 volte con Calibratori 0; il valore medio ($\pm$ SD) ottenuto è $99,13\% \pm 7,37\%$.

11.6. Effetto Hook

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

12. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

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.

Ed. 09/2018

DCM009-12

Dia.Metra S.r.l.

Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

Example Version



DCM009-12
Ed. 09/2018

LH ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of the luteinizing hormone (LH) in human serum or plasma.

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO009

INTENDED USE

Dia.Metra LH ELISA kit is a solid phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of the luteinizing hormone (LH) concentration in human serum or plasma.

LH ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

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.

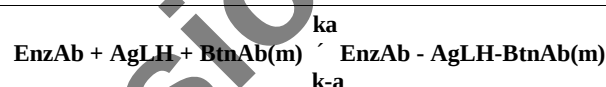
The α-subunit consists of 89 amino acid residues while the β-subunit contains 129 amino acids. The carbohydrate content is between 15% and 30%. The clinical usefulness of the measurement of luteinizing hormone (LH) in ascertaining the homeostasis of fertility regulation via the hypothalamic - pituitary - 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 bioassay (3) to the procedurally simple and rapid immunoenzymometric assays.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

Immunoenzymometric assay.

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 labeled 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:



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

AgLH = native antigen (variable quantity)

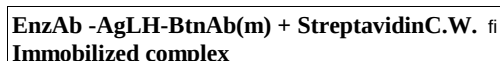
EnzAb = enzyme labeled antibody (excess quantity)

EnzAb-AgLH-BtAb(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 immobilized on well.

Immobilized complex = antibodies-antigen sandwich bound.

After equilibrium is attained, the antibody-bound fraction is separated from unbound antigen by a washing step. The enzyme activity in the antibody-bound fraction is directly proportional to the native antigen concentration. 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.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

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)

Control concentration is indicated on the Certificate of Analysis **REF DCE045/0903-0**

3. Conjugate (1 vial, 12 mL)

Antibodies anti LH conjugated with Horseradish peroxidase (HRP) and anti LH biotinylated

REF DCE002/0902-0

4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

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)

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (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 **REF DCE006-0**

3.1. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.2. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

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

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

4. WARNINGS

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

- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of LH from 5 mIU/mL to 200 mIU/mL.

5. PRECAUTIONS

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

6. PROCEDURE

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

The Calibrators are ready to use, are calibrated against the international 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

For sample with concentration over 200 mIU/mL dilute the sample with the Calibrator 0.

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

6.2. Preparation of the Wash solution

Dilute the contents of each vial of the "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. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2÷8°C.

6.3. Preparation of the sample

The specimens shall be serum or plasma; the usual precautions in the collection of venipuncture samples should be observed.

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

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

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

When assayed in duplicate, 0,040 mL of the specimen is required.

6.4. Procedure

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

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Sample/Control		20 µL	
Calibrator C ₀ -C ₅	20 µL		
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at room temperature (22÷28°C) for 1 hour. Remove the contents from each well and wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22÷28°C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

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

8. RESULTS

5.1. Mean Absorbance

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

5.2. Calibration Curve

Plot the mean value of absorbance (E_m) of the calibrators (C₀-C₄) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).

5.3. Calculation of Results

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

9. EXPECTED VALUES

Reference ranges are hereby reported:

	LH (mIU/mL)
MALE:	0.7 – 7.4
FEMALE:	
Follicular phase	0.5 – 10.5
Ovulation phase	18.4 – 61.2
Lutheal phase	0.5 – 10.5
Menopausal	8.2 – 40.8

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

10. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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. Luteinizing hormone is dependent upon diverse factors other than pituitary homeostasis. Thus, the determination alone is not sufficient to assess clinical status.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Precision

11.1.1. 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 $\leq 9.21\%$.

11.1.2. 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 $\leq 7.91\%$.

11.2. Correlation

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

The regression curve is:

$$\text{Dia.Metra} = 0.91 * (\text{commercial kit}) + 0.05$$

$$R \text{ squared} = 0.971$$

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

The regression curve is:

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

$$R \text{ squared} = 0.981$$

11.3. Sensitivity

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

11.4. Specificity

The cross-reactivity of the Dia.Metra 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 tested	Cross Reactivity
LH	100 %
HCG	0.007 %
Prolactin	N.D.
FSH	N.D.
TSH	N.D.

11.5. 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 $99.13\% \pm 7.37\%$.

11.6. Hook Effect

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

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

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.

Ed. 09/2018

DCM009-12

Dia.Metra S.r.l.

Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

Example Version



DCM009-12

Ed. 09/2018

LH ELISA

para análisis de rutina

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

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

 $\Sigma = 96$ ensayos

REF DKO009

USO PREVISTO

El kit Dia.Metra LH ELISA es un método inmunoenzimático en fase sólida para la determinación cuantitativa de la hormona luteinizante (LH) en suero o plasma humano.

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

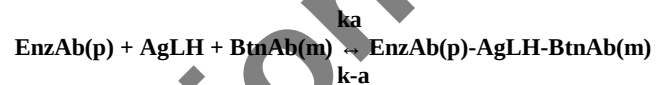
1. IMPORTANCIA CLÍNICA

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 complejo (3) hasta el ensayo más simple y rápido de tipo inmunoenzimático.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Ensayo inmunoenzimático.

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:

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

AgLH = antígeno nativo (cantidad variable)

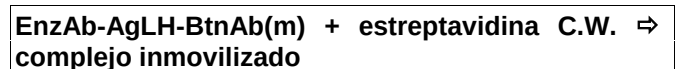
EnzAb = anticuerpo marcado con una enzima (en exceso)

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.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

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

CAL0	REF DCE002/0906-0
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 frasco, 1 mL)

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

REF DCE045/0903-0

3. Conjugado (1 frasco, 12 mL)

Anticuerpos anti LH conjugado con peroxidasa de rabano (HRP) y anti LH biotinilado

REF DCE002/0902-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca)

Estreptavidina absorbida en la microplaca

REF DCE002/0903-0

5. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)

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

REF DCE004-0

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

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

REF DCE005-0

7. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

3.2. Reactivos necesarios no incluidos en el kit

Agua destilada

3.3. Material e instrumental auxiliar

Dispensadores automáticos

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

Notas

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

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

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la

inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.

- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de LH de 5 mIU/mL a 200 mIU/mL

5. PRECAUCIONES

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

- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

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

Los Calibradores son listos para usar, son calibrados frente al estándar internacional WHO 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

Para muestras con una concentración superior a 200 mIU/mL, diluir la muestra con el Calibrador 0.

Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8 °C.

6.2. Preparación de la solución de lavado

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

6.3. Preparación de la muestra

Usar muestras séricas y observar las precauciones habituales en la recogida de muestras obtenidas por vía venosa.

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

Para 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 0,040 mL de la muestra.

6.4. Procedimiento

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

de calibración (C₀-C₅), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivos	Calibrador	Muestras/Control	Blanco
Muestras/Control		20 µL	
Calibrador C ₀ -C ₅	20 µL		
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incubar 1 h a temperatura ambiente (22÷28°C). Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéeela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22÷28°C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.			

7. CONTROL DE CALIDAD

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

Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados.

Se deben emplear métodos estadísticos pertinentes para determinar las tendencias.

Desviaciones significativas del rendimiento establecido pueden indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. RESULTADOS

8.1. Absorbancia media

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

8.2. Curva de calibración

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

8.3. Cálculo de los resultados

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

9. VALORES ESPERADOS

Los intervalos de referencia se indican 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.

10. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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.

11. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

11.1. Precisión

11.1.1. Intraensayo

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

11.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de tres sueros de control

distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es $\leq 7.91\%$.

11.2. Correlación con la dosis RIA

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

La curva de regresión es:

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

$$r^2 = 0,971$$

El kit LH ELISA Dia.Metra (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:

$$Y = 1.08 * (X) - 1.22$$

$$r^2 = 0.981$$

11.3. Sensibilidad

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

11.4. 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.

11.5. 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 $99.13\% \pm 7.37\%$.

11.6. Efecto "Hook"

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

12. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

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.

Ed. 09/2018

DCM009-12

Dia.Metra S.r.l.

Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

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

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

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

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

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

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

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

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

Valori inspiegabilmente fuori scala

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

CV% intrasaggio elevato

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

CV% intersaggio elevato

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

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

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

Too low reaction (too low ODs)

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

Too high reaction (too high ODs)

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

Unexplainable outliers

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

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

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS

No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo

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

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

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

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

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

Valores inexplicablemente fuera de escala

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

CV% intraensayo elevado

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

CV% interensayo elevado

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

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'essai

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

Réaction trop faible (DO trop basse)

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

Réaction trop intense (DO trop élevée)

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

Valeurs inexplicablement hors plage

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

CV% intra-essai élevé

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

CV% inter-essai élevé

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