



Instructions for Use

LH-Urine ELISA

IVD



REF EIA-1290

Σ 96



DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße 18, 35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:



DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti

1	INTENDED USE	2
2	PRINCIPLE OF THE TEST	2
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	3
4	REAGENTS.....	4
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	5
6	ASSAY PROCEDURE.....	5
7	EXPECTED NORMAL VALUES.....	7
8	QUALITY CONTROL.....	7
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	8
10	LIMITATIONS OF USE.....	9
11	LEGAL ASPECTS	9

1	ZWECKBESTIMMUNG	10
2	TESTPRINZIP	10
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	10
4	BESTANDTEILE DES KITS	11
5	PROBENVORBEREITUNG.....	12
6	TESTDURCHFÜHRUNG	12
7	ERWARTETE WERTE	14
8	QUALITÄTSKONTROLLE	14
9	ASSAY-CHARAKTERISTIKA	14
10	GRENZEN DES TESTS	15
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	15

1	DESTINAZIONE D'USO	16
2	PRINCIPIO DEL TEST	16
3	PRECAUZIONI	16
4	COMPONENTI DEL KIT	17
5	CAMPIONI.....	18
6	ATTUAZIONE DEL TEST.....	18
7	VALORI NORMALI	20
8	CONTROLLO QUALITÀ.....	20
9	CARATTERISTICHE DEL TEST	20
10	LIMITAZIONE DEL TEST	21
11	ASPETTI LEGALI	21

12	REFERENCES / LITERATURE.....	22
----	------------------------------	----

	SYMBOLS USED	23
--	--------------------	----

1 INTENDED USE

The **DRG LH-Urine ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of Luteinizing hormone (LH) in urine.

This test is used to detect the midcycle LH surge in urine, which is an aid in predicting the time of ovulation.

1.1 Summary and Explanation

Luteinizing hormone (LH) is produced in both men and women by gonadotropic cells in the anterior pituitary gland in response to luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH or Gn-RH), which is released by the hypothalamus (1,2).

LH is also called interstitial cell-stimulating hormone (ICSH) in men. LH is a heterodimeric glycoprotein with a molecular weight of approximately 30 kDa. The protein dimer contains 2 glycopeptidic subunits, labeled alpha and beta subunits that are non-covalently associated (4). While the LH alpha subunit is identical to that found in human thyroid-stimulating hormone (TSH), follicle stimulating hormone (FSH), and human chorionic gonadotropin (hCG), the beta subunit differs between these hormones (2,4).

The basal secretion of LH in men is episodic and has the primary function of stimulating the interstitial cells (Leydig cells) to produce testosterone. The variation in LH concentrations in women is subject to the complex ovulatory cycle of healthy menstruating women, and depends upon a sequence of hormonal events along the gonado-hypothalamic-pituitary axis. The decrease in progesterone and estradiol levels from the preceding ovulation initiates each menstrual cycle (5). As a result of the decrease in hormone levels, the hypothalamus increases the secretion of gonadotropin-releasing factors (GnRF), which in turn stimulates the pituitary to increase FSH production and secretion (4). The rising FSH levels stimulate several follicles during the follicular phase, one of these will mature to contain the egg. As the follicle develops, estradiol is secreted, peaking by day 12 or 13 of a normal cycle. LH is released as a result of this rapid increase of estradiol because of direct stimulation of the pituitary and increasing GnRF and FSH levels (2,5). This "LH surge" triggers ovulation approximately 12 to 18 hours after LH reaches a maximum level. This not only releases the egg from the follicle, but also initiates the conversion of the residual follicle into the corpus luteum which secretes progesterone and estrogen - two negative feedback regulators of LH on the hypothalamic-pituitary axis (3-8). The corpus luteum regresses if pregnancy does not occur, and the corresponding drop in progesterone and estradiol levels results in menstruation.

If pregnancy occurs, LH levels will decrease, and luteal function will instead be maintained by the action of hCG, a hormone very similar to LH but secreted from the new placenta. hCG causes the corpus luteum to continue producing progesterone and estradiol.

In the differential diagnosis of hypothalamic, pituitary, or gonadal dysfunction, assays of LH concentration are routinely performed in conjunction with FSH assays since their roles are closely interrelated. Furthermore, the hormone levels are used to determine menopause, pinpoint ovulation, and monitor endocrine therapy.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DRG LH-Urine ELISA is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the **sandwich principle**.

The microtiter wells are coated with a monoclonal (mouse) antibody directed towards a unique antigenic site of the β -subunit of the LH molecule.

During the first incubation, the β -subunit of the LH molecule in the added sample binds to the immobilized antibody. After incubation, the added conjugate solution, which contains an anti-LH antibody conjugated to horseradish peroxidase, binds to the LH forming a sandwich complex.

After a washing step, to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate solution. The colorimetric reaction is abruptly stopped by addition of stop solution and optical density (OD) of the resulting yellow product is measured. The intensity of color is proportional to the concentration of the analyte in the sample.

A standard curve is constructed by plotting OD values against concentrations of standards, and concentrations of unknown samples are determined using this standard curve.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (20 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with Stop Solution containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DRG.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with anti- β -subunit LH antibody (monoclonal).
2. **Standard (Standard 0 - 5)**, 6 vials, 1 mL each, lyophilized;
Concentrations: 0 – 10 – 20 – 40 – 100 – 200 mIU/mL
The standards are calibrated against the following reference material: WHO International Standard Luteinizing Hormone, Human, Pituitary, NIBSC code: 80/552;
See "Reagent Preparation".
Contain non-mercury preservative.
3. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 11 mL, ready to use;
Anti-LH antibody conjugated with horseradish peroxidase;
Contains non-mercury preservative.
4. **Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use;
Tetramethylbenzidine (TMB).
5. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use;
Contains 0.5 M H₂SO₄.
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
6. **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated);
See "Reagent Preparation".

4.2 Materials required but not provided

- A calibrated microtiter plate reader (450 nm, with reference wavelength at 620 nm to 630 nm) (e.g. the DRG Instruments Microtiter Plate Reader)
- Calibrated variable precision micropipettes
- Absorbent paper
- Distilled water
- Timer
- Graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for 4 weeks if stored as described above.

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature (20 °C to 26 °C) prior to use.

Standards

Reconstitute the lyophilized contents of each vial with 1 mL distilled water and let stand for at least 10 minutes at room temperature. Mix several times before use.

Note: After first use the reconstituted standards should be aliquoted and stored immediately at -20 °C.

Wash Solution

Add distilled water to the 40X concentrated Wash Solution.

Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL distilled water to a final volume of 1200 mL.

The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit and all used materials/reagents must be performed according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet, section 13.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any damage to the test kit or components, DRG must be informed in writing, at the latest one week after receiving the kit. Damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed of according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Urine has to be used in this assay.

ATTENTION! This kit is for use with samples without additives only.

5.1 Specimen Collection

It is recommended to collect the first morning urine (after fasting).

First clean genital area with mild disinfectant to prevent contamination. Then collect clean-catch midstream urine in an appropriate sterile container without preservatives.

Directly after collection, the urine should be centrifuged for 5 to 10 minutes (e.g. at 2,000 g) to remove cellular debris. Use supernatant for analyte quantification.

The variation in LH concentrations in women is subject to the complex ovulatory cycle of healthy menstruating women.

5.2 Specimen Storage and Preparation

The urine supernatant should be capped and may be stored for up to 7 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying. The supernatants cannot be stored frozen.

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **50 µL** of each **Standard**, control and sample with new disposable tips into appropriate wells.
3. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
4. Dispense **100 µL Enzyme Conjugate** into each well.
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
5. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
6. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **3 times** with **300 µL** diluted *Wash Solution* per well for manual washing. Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
Important note:
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
7. Add **100 µL of Substrate Solution** to each well.
8. Incubate for **10 minutes** at room temperature.
9. Stop the enzymatic reaction by adding **50 µL of Stop Solution** to each well.
10. Determine the absorbance (OD) of the solution in each well at **450 nm (reading) and at 620 nm to 630 nm (background subtraction, recommended)** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using semi-logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4-Parameter curve fit. (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as > 200 mIU/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard 0 (0 mIU/mL)	0.02
Standard 1 (10 mIU/mL)	0.16
Standard 2 (20 mIU/mL)	0.30
Standard 3 (40 mIU/mL)	0.50
Standard 4 (100 mIU/mL)	1.22
Standard 5 (200 mIU/mL)	2.30

7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

Using the DRG LH-Urine ELISA the following values are observed:

Population	Age (years)	n	Mean (mIU/mL)	Range (mIU/mL)
Males:				
pre-pubescent	< 10	10	1.1	0 – 2.9
adult	18 – 65	30	4.6	1.0 – 13.8
Females:				
pre-pubescent	< 10	8	0.8	0 – 1.5
adult	20 – 36	47	14.8	0.6 – 96.2
follicular and luteal phase				< 20
LH surge				40 – 200
post-menopausal	46 – 60	23	36.3	8.4 – 102.0

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DRG directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.287 – 200 mIU/mL.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross-Reactivity)

The following substances were tested for cross-reactivity of the assay:

Substance	Added Conc. (mIU/mL)	Measured Conc. (mIU/mL)	Cross-reactivity (%)
hCG (WHO RR, NIBSC code: 99/688)	20 – 20 000	0.0	0.0
βhCG (IRP, NIBSC code: 75/551)	20 – 20 000	0.0	0.0
FSH (WHO IS, NIBSC code: 92/510)	3 – 3000	0.0	0.0
TSH (WHO RR, NIBSC code: 94/674)	0.3 – 300	0.0	0.0

9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the DRG ELISA was calculated by adding 2 standard deviations to the mean of 20 replicate analyses of the *Standard 0* and was found to be 0.0001 mIU/mL.

The Limit of Blank (LoB) is 0.016 mIU/mL.

The Limit of Detection (LoD) is 0.287 mIU/mL.

The Limit of Quantification (LoQ) is 3.272 mIU/mL.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra-Assay

The within-assay variability was determined by measuring each sample 10 times per run (n = 10):

Sample	n	Mean (mIU/mL)	CV (%)
1	10	5.3	2.7
2	10	16.3	2.7
3	10	39.5	1.3
4	10	50.2	2.3

9.4.2 Inter-Assay

The between-assay variability was determined by measuring each sample 10 times per run for 3 days (n = 30):

Sample	n	Mean (mIU/mL)	CV (%)
1	30	5.9	9.8
2	30	16.8	3.9
3	30	40.6	2.8
4	30	50.4	2.8

9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding LH solutions with known concentrations.

The recovery (%) was calculated by multiplying the ratio of measured and expected values with 100.

		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Concentration (mIU/mL)		1.6	5.9	8.5	12.9
Average Recovery (%)		96.0	95.7	105.1	93.6
Range of Recovery (%)	from	88.9	89.6	103.8	85.5
	to	102.1	100.9	105.8	98.8

9.6 Linearity

Samples were measured undiluted and in serial dilutions with standard 0. The recovery (%) was calculated by multiplying the ratio of expected and measured values with 100.

		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Concentration (mIU/mL)		22.2	24.1	49.6	59.6
Average Recovery (%)		96.9	104.2	109.7	103.7
Range of Recovery (%)	from	93.5	101.5	106.1	86.9
	to	100.3	106.9	112.7	114.7

10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice.

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of LH in a sample.

10.2 High-Dose-Hook Effect

Hook effect was not observed in this test up to a concentration of 4000 mIU/mL of LH.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DRG.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2 are also invalid.

Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

1 ZWECKBESTIMMUNG

Der **DRG LH-Urine ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung des Luteinisierenden Hormons (LH) in Urin eingesetzt. Der Test dient dem Nachweis des plötzlichen Konzentrationsanstiegs von LH in der Zyklusmitte (ovulatorischer Peak), was hilfreich ist bei der Berechnung des Zeitpunkts des Eisprungs.

Nur für *In-vitro* Diagnostik.

2 TESTPRINZIP

Der DRG LH-Urine ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der **Sandwichtechnik** basiert.

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine definierte Antikörper-Bindungsstelle der β -Untereinheit des LH-Moleküls gerichtet ist.

Während der ersten Inkubation bindet die β -Einheit des LH-Moleküls in der zugegebenen Probe an den immobilisierten Antikörper. Die Konjugatlösung, die nach der Inkubationszeit zugegeben wird und einen an Meerrettichperoxidase konjugierten Anti-LH-Antikörper enthält, bindet an das LH unter Bildung eines Sandwich-Komplexes.

Nach einem Waschschrift, um alle ungebundenen Substanzen zu entfernen, wird die feste Phase mit der Substratlösung inkubiert. Die Reaktion wird durch die Zugabe der Stopplösung beendet und die optische Dichte (OD) des resultierenden gelben Produktes gemessen. Die Intensität der Farbe ist proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe.

Durch Auftragen der OD-Werte gegen die Konzentrationen der Standards wird eine Standardkurve erstellt, und die Konzentrationen der unbekanntenen Proben werden anhand dieser Standardkurve bestimmt.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0,5 M H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DRG Instruments GmbH erhältlich.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar);
Mit anti- β -LH-Antikörper (monoklonal) beschichtet.
2. **Standard (Standard 0 - 5)**, 6 Fläschchen, je 1 mL, lyophilisiert;
Konzentrationen: 0 – 10 – 20 – 40 – 100 – 200 mIU/mL
Die Standards sind gegen das folgende Referenzmaterial kalibriert: WHO International Standard Luteinizing Hormone, Human, Pituitary, NIBSC code: 80/552;
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 11 mL, gebrauchsfertig;
Anti-LH-Antikörper mit Meerrettichperoxidase konjugiert;
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
Substratlösung TMB.
5. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
enthält 0,5 M H₂SO₄,
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
6. **Wash Solution** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X** konzentriert;
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät (450 nm, mit Referenzwellenlänge bei 620 nm bis 630 nm), (z.B. das DRG Instruments Mikrotiterplattenlesegerät)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser
- Laborwecker
- Millimeterpapier oder Software zur Datenauswertung

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits 4 Wochen ihre Reaktivität.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) gebracht werden.

Standards

Das Lyophilisat in jedem Fläschchen mit 1 mL destilliertem Wasser auflösen und mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Vor der Verwendung mehrere Male mischen.

Achtung: *Nach dem ersten Gebrauch müssen die rekonstituierten Standards portioniert und bei -20 °C eingefroren werden.*

Wash Solution

Die 40-fach konzentrierte *Wash Solution* (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen.

Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits und aller verwendeten Materialien / Reagenzien muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt, Abschnitt 13.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DRG in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Beschädigte Einzelkomponenten dürfen nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen aufbewahrt werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENVORBEREITUNG

Urin wird in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt.

ACHTUNG: Dieser Testkit ist nur für die Verwendung von Proben ohne Zusätze.

5.1 Probenentnahme

Es wird empfohlen, den ersten Morgenurin (nüchtern) zu sammeln.

Um Kontaminationen zu vermeiden, den Genitalbereich zuerst mit einem milden Desinfektionsmittel reinigen. Mittelstrahl-Urin in einem geeigneten sterilen Gefäß ohne Konservierungsmittel sammeln.

Sofort nach Erhalt der Urinproben, sollten diese für 5 - 10 Minuten zentrifugiert werden (z.B. bei 2000 g), um Zellreste zu entfernen. Der Überstand wird für die Messung eingesetzt.

Die Schwankungen der LH-Konzentrationen bei Frauen unterliegen dem komplexen Ovulationszyklus gesunder, menstruierender Frauen.

5.2 Probenaufbewahrung

Der Urinüberstand sollte stets gut verschlossen sein und kann vor Testbeginn bis zu 7 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Der Überstand kann nicht gefroren gelagert werden.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 50 µL Standard**, Kontrollen und **Proben mit neuen Plastikspitzen** in die entsprechenden Wells geben.
3. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
4. **100 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben.
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
5. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln.
Wells **3-mal** mit **300 µL** verdünnter *Wash Solution* waschen bei manueller Durchführung.
Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
7. **100 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
8. **10 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
9. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
10. Die Optische Dichte (OD) bei **450 nm (Messung) und 620 nm bis 630 nm (Abzug des Hintergrundes, empfohlen)** mit einem Mikrotiterplattenleser innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der *Stop Solution* bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter-Gleichung bestimmt. (4 Parameter Rodbard oder 4 Parameter Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DRG ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard 0 (0 mIU/mL)	0,02
Standard 1 (10 mIU/mL)	0,16
Standard 2 (20 mIU/mL)	0,30
Standard 3 (40 mIU/mL)	0,50
Standard 4 (100 mIU/mL)	1,22
Standard 5 (200 mIU/mL)	2,30

7 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

Mit dem DRG LH-Urine ELISA ergaben sich folgende Werte:

Population	Alter (Jahre)	n	Mittelwert (mIU/mL)	Bereich (mIU/mL)
Männer:				
vorpubertär	< 10	10	1.1	0 – 2,9
erwachsen	18 – 65	30	4.6	1.0 – 13,8
Frauen:				
vorpubertär	< 10	8	0.8	0 – 1,5
normale Erwachsene	20 – 36	47	14.8	0,6 – 96,2
Follikular- und Lutealphase				< 20
LH-Anstieg				40 – 200
post-menopausal	46 – 60	23	36.3	8,4 – 102,0

Die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für therapeutische Konsequenzen dienen. Die Ergebnisse müssen zusammen mit anderen klinischen Befunden und diagnostischen Tests des Patienten interpretiert werden.

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DRG in Verbindung.

9 ASSAY-CHARAKTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,287 - 200 mIU/mL.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert, zuzüglich der zweifachen Standardabweichung, des *Standard 0* (n = 20), beträgt 0,0001 mIU/mL.

Der „Limit of Blank“ (LoB) ist 0,016 mIU/mL.

Die Nachweisgrenze (LoD) ist 0,287 mIU/mL.

Die Quantifizierungsgrenze (LoQ) ist 3,272 mIU/mL.

Die Daten zu:

9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

10 GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit vollständigem Verständnis der Anweisungen in der Gebrauchsanleitung und unter Befolgung der GLP (Good Laboratory Practice)-Richtlinien durchgeführt wird.

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikation dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Beeinflussung durch Medikamente

Bislang sind uns keine Substanzen (Medikamente) bekannt geworden, die einen Einfluss auf die Bestimmung von LH in einer Probe haben.

10.2 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test bis zu einer Konzentration von 4000 mIU/mL LH nicht auf

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DRG in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1 genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2 erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

1 DESTINAZIONE D'USO

Il test immuno-enzimatico **DRG LH-Urine ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa dell'ormone luteinizzante (LH) nelle urine.

Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test kit DRG LH-Urine ELISA è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati su un substrato (ELISA) basato sul **principio sandwich**.

I micropozzetti sono ricoperti con un anticorpo monoclonale diretto contro un unico sito antigenico su una molecola β -LH. Durante la prima incubazione, la molecola LH nel campione aggiunto si lega all'anticorpo immobilizzato.

Il coniugato enzimatico, che viene aggiunto dopo il tempo di incubazione, contenente un anticorpo anti-LH coniugato alla perossidasi di rafano, si lega all'LH formando un complesso sandwich.

Dopo una fase di lavaggio, per rimuovere tutte le sostanze non legate, la fase solida viene incubata con la soluzione di substrato. La reazione colorimetrica viene bruscamente interrotta dall'aggiunta della soluzione di arresto e viene misurata la densità ottica (DO) del prodotto giallo risultante. L'intensità del colore è proporzionale alla concentrazione dell'analita nel campione.

Una curva standard è costruita tracciando i valori di DO contro le concentrazioni di standard, e le concentrazioni di campioni sconosciuti sono determinate usando questa curva standard.

3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.
- Informazioni su sostanze pericolose contenute nel kit sono riportate nel regolamento di sicurezza.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la *Stop Solution* dovrebbe essere evitato perché contiene 0,5 M H_2SO_4 . L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati magazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta DRG Instruments GmbH.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

1. **Microtiterwells** (Micropozzetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti;
Pozzetti ricoperti con l'anti- β -LH anticorpo (monoclonale)
2. **Standard (Standard 0 - 5)**, 6 flaconi, 1 mL ognuno, liofilizzato;
Concentrazione: 0 – 10 – 20 – 40 – 100 – 200 mIU/mL
Gli standard sono standardizzati contro il seguente materiale di riferimento: WHO International Standard Luteinizing Hormone, Human, Pituitary, NIBSC code: 80/552;
Vedi "Preparazione dei reagenti".
Contiene conservante senza mercurio.
3. **Enzyme Conjugate** (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 11 mL, pronto all'uso;
Anti-LH anticorpo coniugato alla perossidasi di rafano;
Contiene conservante senza mercurio.
4. **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;
TMB (benzidine tetrametilico).
5. **Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;
Contiene 0,5 M H₂SO₄.
Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
6. **Wash Solution** (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (concentrata 40X);
vedi „preparazione dei reagenti“.

4.2 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Lettore di piastre di microtitolazione calibrato (450 nm, con lunghezza d'onda di riferimento a 620 nm a 630 nm) (p.es. il DRG Instruments Microtiterplate Reader)
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile
- Carta assorbente
- Acqua distillata
- Timer
- Carta millimetrata o software per il calcolo dei dati

4.3 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2 °C a 8 °C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data.

Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente.

Test kits aperti rimangono attivi per 4 settimane se magazzinati alle condizioni sopra descritte.

4.4 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente (20 °C a 26 °C).

Standards

Ricostituire il contenuto liofilizzato di ogni flacone con 1 mL acqua distillata e lasciare per almeno 10 minuti a temperatura ambiente. Mescolare alcune volte prima dell'uso.

Nota: Dopo il primo utilizzo gli standard ricostituiti devono essere aliquotati e conservati immediatamente a -20 °C.

Wash Solution

Diluire 30 mL *Wash Solution* concentrata con 1170 mL di acqua distillata fino ad un volume finale di 1200 mL.

La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 2 settimane a temperatura ambiente.

4.5 Smaltimento del kit

La discarica del kit e di tutti i materiali/reagenti usati devono avvenire secondo i regolamenti nazionali. Informazioni aggiuntive per questo prodotto si trovano nel scheda di dati di sicurezza, capitolo 13.

4.6 Test kits danneggiati

In caso di alcun danno al test kit o ai suoi componenti, DRG deve essere informato per iscritto, al Massimo una settimana dopo la ricezione del kit. Componenti singoli danneggiati non devono essere usati per un saggio. Questi devono essere conservati fino ad aver trovato una soluzione finale. Dopo, questi componenti devono essere scaricati secondo i regolamenti ufficiali.

5 CAMPIONI

I campioni di urina devono essere utilizzati in questo test.

ATTENZIONE: Questo kit è da utilizzare solo con campioni senza additivi.

5.1 Collezione dei campioni

Si raccomanda di raccogliere l'urina del primo mattino (a digiuno).

Pulire l'area genitale con un disinfettante leggero per prevenire contaminazioni. Poi raccogliere il secondo getto di urina in un apposito contenitore sterile senza conservanti.

Direttamente dopo la raccolta, centrifugare l'urina per 5 - 10 minuti (p.es. a 2000 g) per rimuovere detriti cellulari.

Usare il surnatante per la quantificazione dell'analita.

La variazione delle concentrazioni di LH nelle donne è soggetta al complesso ciclo ovulatorio delle donne mestruate sane.

5.2 Magazzinaggio dei campioni

Il surnatante può essere conservato fino a 7 giorni a 2 °C a 8 °C prima del saggio.

I surnatanti non possono essere conservati congelati.

6 ATTUAZIONE DEL TEST

6.1 Indicazioni generali

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente e ben mescolati prima dell'uso. Evitare la formazione di schiume.
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.

6.2 Eseguito del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Pipettare **50 µL** di ogni **Standard**, controllo e campione nei pozzetti, cambiando ogni volta la punta monouso.
3. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
4. Pipettare **100 µL Enzyme Conjugate** in ogni pozzetto.
Agitare bene per 10 secondi. È molto importante raggiungere un completo mescolamento.
5. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
6. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **3 volte** con **300 µL Wash Solution** diluita in ogni pozzetto per il lavaggio manuale.
Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
Importante:
La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto eseguito del lavaggio!
7. Aggiungere **100 µL** della **Substrate Solution** ad ogni pozzetto.
8. Incubare per **10 minuti** a temperatura ambiente.
9. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **50 µL** della **Stop Solution** ad ogni pozzetto.
10. Determinare la densità ottica (OD) della soluzione in ogni pozzetto **a 450 nm (lettura) e a 620 nm a 630 nm (sottrazione dello sfondo, raccomandata)** con un lettore di piastre di microtitolazione.
Si raccomanda di leggere i pozzetti entro **10 minuti** dall'aggiunta della **Stop Solution**.

6.3 Rilevamento dei risultati

1. Determinare i valori medi della densità ottica per ogni set di standard, controlli e campioni.
2. Costruire una curva standard: riportare i valori medi della densità ottica (OD) di ogni standard contro la rispettiva concentrazione dove i valori delle OD si devono trovare sull'asse verticale (Y) e le concentrazioni sull'asse orizzontale (X).
3. Utilizzando il valore medio delle OD per ogni campione si determina la rispettiva concentrazione dalla curva standard.
4. Metodo automatico: I valori riportati in queste istruzioni per l'uso sono stati determinati tramite l'equazione a 4 parametri. (I metodi preferiti sono 4 Parameter Rodbard oppure 4 Parameter Marquardt.) Altri funzioni usati per l'elaborazione dei dati possono dare risultati leggermente differenti.
5. La concentrazione dei campioni può essere determinata direttamente dalla curva standard. Campioni con una concentrazione più elevata dello standard più concentrato devono essere diluiti. Di questo fattore di diluizione deve essere tenuto conto per il calcolo della concentrazione.

6.3.1 Esempio di una curva standard tipica

I seguenti dati sono a scopo dimostrativo soltanto e **non possono** sostituire i dati generati dall'eseguito del test.

Standard	Densità ottiche (450 nm)
Standard 0 (0 mIU/mL)	0,02
Standard 1 (10 mIU/mL)	0,16
Standard 2 (20 mIU/mL)	0,30
Standard 3 (40 mIU/mL)	0,50
Standard 4 (100 mIU/mL)	1,22
Standard 5 (200 mIU/mL)	2,30

7 VALORI NORMALI

È consigliabile che ogni laboratorio determini i propri valori normali e anormali.

Utilizzando il DRG LH-Urine ELISA si osservano i seguenti valori:

Popolazione	Età (anni)	n	Media (mIU/mL)	Intervallo (mIU/mL)
Uomini:				
pre-pubescenti	< 10	10	1.1	0 – 2.9
adulti	18 – 65	30	4.6	1.0 – 13.8
Donne:				
pre-pubescenti	< 10	8	0.8	0 – 1.5
adulte	20 – 36	47	14.8	0.6 – 96.2
fase follicolare e luteale				< 20
Aumento di LH				40 – 200
post-menopausa	46 – 60	23	36.3	8.4 – 102.0

Come per tutti i test diagnostici, una diagnosi clinica definitiva **non** dovrebbe basarsi sui risultati di un singolo dosaggio. Una diagnosi clinica dovrebbe essere formulata dal medico in seguito ad un'attenta valutazione di tutti gli aspetti clinici assieme ai dati di laboratorio.

8 CONTROLLO QUALITÀ

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge. Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno. Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.

Le referenze con i rispettivi risultati del laboratorio QC sono elencati nel QC certificato, che è allegato al kit. I valori riportati nel QC certificato si riferiscono al lotto del kit attuale e dovrebbero essere utilizzati per un raffronto dei risultati.

È altresì consigliabile di partecipare a programmi di sicurezza sulla qualità nazionali o internazionali, per assicurarsi dell'esattezza dei risultati.

Appropriati metodi statistici per l'analisi dei valori controllo e delle rappresentazioni grafici dovrebbero essere adoperati. Nel caso che i risultati del test non combaciano con il campo di accettazione indicato dal materiale di controllo, i risultati dei pazienti devono essere considerati invalidi. In questo caso si prega di controllare i seguenti fattori d'errore: pipette, cronometri, fotometro, data di scadenza dei reagenti, condizione di magazzinaggio e d'incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio.

Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DRG.

9 CARATTERISTICHE DEL TEST

9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 0,287 - 200,0 mIU/mL.

9.2 Specificità degli anticorpi (reazioni ad incrocio)

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.3 Sensitività analitica

La sensitività analitica è stata calcolata dai valori medi, più due volte la deviazione standard, di venti (20) repliche dello *Standard 0* ed erano 0,0001 mIU/mL.

Il limite del bianco (LoB) è 0,016 mIU/mL.

Il limite di rilevabilità (LoD) è 0,287 mIU/mL.

Il limite di quantificazione (LoQ) è 3,272 mIU/mL.

Dati dettagliati su

9.4 Precisione

9.5 Recupero

9.6 Linearità

si prega di consultare le dettagliate istruzioni per l'uso in inglese.

10 LIMITAZIONE DEL TEST

Risultati affidabili e riproducibili saranno ottenuti quando il procedimento del test è seguito con una comprensione completa delle istruzioni all'uso e seguendo una buona pratica di laboratorio (GLP).

Ogni manutenzione impropria dei campioni o modificazione al saggio può influenzare i risultati.

10.1 Sostanze interferenti

10.2 Droghe interferenti

Fino ad oggi nessuna sostanza (farmaco) è conosciuta a noi che abbia influenzato la determinazione di LH nel campione.

10.3 Effetto Hook (Gancio) ad alto dosaggio

Nessun effetto Hook (gancio) è stato osservato in questo prodotto fino a 4000 mIU/mL di LH.

11 ASPETTI LEGALI

11.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test.

I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DRG.

11.2 Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente.

Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche.

Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

11.3 Responsabilità legali












Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento.

Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2. Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

12 REFERENCES / LITERATURE

1. Ooi GT, Tawadros N, Escalona RM. Pituitary cell lines and their endocrine applications. *Mol Cell Endocrinol.* 2004, 30;228(1-2):1-21.
2. Nedresky D, Singh G. Physiology, Luteinizing Hormone. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019.
3. Gonadotropins. Chapter 7 in *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-2018.
4. Nussey S, Whitehead S. Oxford. *Endocrinology*. BIOS Scientific Publishers; 2001.
5. Fares F. The role of O-linked and N-linked oligosaccharides on the structure-function of glycoprotein hormones: development of agonists and antagonists. *Biochim Biophys Acta.* 2006, 1760(4):560-7.
6. Messinis IE, Messini CI, Dafopoulos K. Novel aspects of the endocrinology of the menstrual cycle. *Reprod Biomed Online.* 2014, 28(6):714-22.
7. Messinis IE. Modulatory effect of the ovary on LH secretion. *Ann N Y Acad Sci.* 2003,997:35-41.
8. Mihm M, Gangooly S, Muttukrishna S. The normal menstrual cycle in women. *Anim Reprod Sci.* 2011, 124(3-4):229-36.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence
	Batch code *	Chargencode *	Lotto no	Número de lote	No. de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen / Anzahl	Volume / Quantità	Volumen / Número	Volume / Quantité
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Micropozzetti	Placas multipocillo	Plaques de micro-titration
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisiero	Antisero	Antisérum
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Tracciante enzimatico	Conjugado enzimático	Conjugué enzymatique
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complesso enzimatico	Complejo enzimático	Complexe enzymatique
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Soluzione di substrato	Solución de sustrato	Solution substrat
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Soluzione d'arresto	Solución de parada	Solution d'arrêt
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Standard zero	Estándar cero	Zero Standard
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Controllo	Control	Contrôle
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampone del test	Tampón de ensayo	Tampon d'essai
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Soluzione di lavaggio	Solución de lavado	Solution de lavage
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)	1N NaOH	1N NaOH
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl		1 N HCl	1N HCl
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungsmedium	Diluyente dei campioni	Solución para dilución de la muestra	Solution pour dilution de l'échantillon
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungsmedium	Diluyente del tracciante	Solución para dilución del conjugado	Solution pour dilution du conjugué