

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	3
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	6
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	7
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	8
11. ЛИТЕРАТУРА	8

CONTENT

1. INTENDED USE	9
2. SUMMARY AND EXPLANATION	9
3. PRINCIPLE OF THE TEST	10
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	10
5. KIT COMPONENTS	11
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	12
7. TEST PROCEDURE	12
8. QUALITY CONTROL	13
9. CALCULATION OF RESULTS	14
10. EXPECTED VALUES	14
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	15
12. LITERATURE	15

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «ЛГ-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ЛГ-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации лютеинизирующего гормона в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Лютеинизирующий гормон (ЛГ) – гликопротеид с молекулярной массой около 28000 Да. Он секретруется гонадотропными клетками передней доли гипофиза. У женщин ЛГ регулирует функцию желтого тела и стимулирует биосинтез прогестерона. У мужчин ЛГ стимулирует образование тестостерона в интерстициальных клетках Лейдига. Уровень гормона в течение менструального цикла остается низким, за исключением середины цикла, когда его концентрация может возрастать в 5–10 раз. Примерно за 12 часов до возникновения пика ЛГ ему предшествует пик эстрадиола, а сама овуляция происходит спустя 12–20 часов после достижения максимальной концентрации ЛГ. У женщин гормон стимулирует разрыв яичника и образование желтого тела, которое начинает секретировать в кровь прогестерон, увеличивая таким образом его концентрацию в лютеиновую фазу. Содержание ЛГ в крови как у мужчин, так и у женщин зависит от суточного ритма, поэтому определение этого гормона следует проводить в одно и то же время. Периодические увеличения концентрации ЛГ более выражены у женщин (в зависимости от стадии менструального цикла). Так, колебания уровня гормона становятся менее частыми в конце лютеиновой стадии, а их выраженность – в конце фолликулиновой. Увеличение концентрации ЛГ наблюдается при первичной дисфункции половых желез; аменорее, вызванной недостаточностью яичников; синдроме Штейна-Левенталя; менопаузе. Снижение концентрации ЛГ наблюдается при нарушении функции гипофиза или гипоталамуса; синдроме галактореи-аменорреи; изолированном дефиците гонадотропных гормонов; изолированном дефиците ЛГ («фертильный евнух»); невротической анорексии; задержке роста и полового созревания; приеме дигоксина, мегестрола, фенотиазина, прогестерона, эстрогенов.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение лютеинизирующего гормона основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к бета-цепи ЛГ человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание ЛГ, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к альфа-цепи ЛГ/ФСГ/ХГ человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации лютеинизирующего гормона в исследуемом образце. Концентрацию лютеинизирующего гормона в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания лютеинизирующего гормона в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность.

Перекрестная реакция мышинных моноклональных антител к бета-цепи ЛГ с другими анализитами приведена в таблице:

Аналит	Перекрестная реакция, %
ХГ	<0.1
ФСГ	<0.1
ТТГ	<0.1

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания ЛГ в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «ЛГ-ИФА» не превышает 8,0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации ЛГ в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей ЛГ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 5–100 МЕ/л и составляет $\pm 10,0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации ЛГ предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 25 МЕ/л. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «ЛГ-ИФА» концентрация ЛГ в сыворотке (плазме) крови не превышает 0.3 МЕ/л.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1 P202Z	SORB MTP	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт	-
2 C202Z	CAL 1-5	Калибровочные пробы на основе сыворотки, содержащие известные количества лютеинизирующего гормона – 0; 5; 25; 50; 100 МЕ/л , готовы к использованию (калибровочная проба 0 МЕ/л – 2 мл, остальные – по 0.8 мл каждая)	5	шт	прозрачные жидкости красного цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3 Q202Z	CONTROL	Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием лютеинизирующего гормона, готова к использованию (0.8 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
4 T202Z	CONJ HRP	Конъюгат , готов к использованию (11 мл)	1	шт	прозрачная жидкость красного цвета
5 R055Z	SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензидаина (ТМБ) , готов к использованию (11 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
6 S008Z	BUF WASH 21X	Концентрат отмывочного раствора , 21х-кратный (22 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
7 R050Z	STOP	Стоп-реагент , готов к использованию (11 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
8 N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт	-
9 K2021	-	Инструкция по применению Набора реагентов «ЛГ-ИФА»	1	шт	-
10 K202Q	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «ЛГ-ИФА»	1	шт	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18\dots+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2\dots+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора +20 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «ЛГ-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

Допускается однократное замораживание (-20 °С) калибровочных проб и контрольной сыворотки в аликвотах.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации лютеинизирующего гормона в контрольной сыворотке.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 12 лунок для калибровочной проб и контрольной сыворотки.
2	Если предполагаемая концентрация ЛГ в исследуемом образце превышает 100 МЕ/л, его следует дополнительно развести, используя калибровочную пробу 0. Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может искажать результаты определения! Примечание. Для получения надежных результатов рекомендуется использовать несколько последовательных разведений исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови.
3	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
4	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сыоротки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5–10 минут.
5	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 60 минут при температуре +37 °С.
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз. При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.
7	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
8	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
9	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по калибровочной пробе С1.
10	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (х) – концентрация ЛГ в калибровочных пробах (МЕ/л), ось ординат (у) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
11	Определите по калибровочному графику содержание ЛГ в исследуемых образцах. Если исследуемый образец предразводили (см. п. 2), умножьте полученный результат на фактор разведения.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами GLP (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Примечание. Значения концентраций ЛГ в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (0.3 МЕ/л), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (100 МЕ/л) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация ЛГ ниже 0.3 МЕ/л или выше 100 МЕ/л.

Исследуемая группа	Единицы: МЕд/л	
	Нижний предел	Верхний предел
Дети до 11 лет	1,0	5,0
Мужчины	1,5	9,0
Женщины		
Фазы цикла:		
фолликулярная	2,0	9,5
овуляция	10,0	45
лютеиновая	0,5	17
менопауза	5,0	57

11. ЛИТЕРАТУРА

1. Pierce, J.G. and Parsons, T.F. Glycoprotein hormones: Structure and Function, Annual Rev. Biochem., 50, 465-495 (1981).
2. Harris, G.W. and Naftolin, The Hypothalamus and Control of Ovulation, Brit. Med. Bullet., 26, 1-9 (1970).
3. Knobil, E., The Neuroendocrine Control of the Menstrual Cycle, Rec. Prog. Horm Res., 36, 52...+88 (1980).
4. Jeffcoate, S.L., Clinics in Endocrinol. Metab., 4, 521-543 (1975).
5. Whitely, R.J., Keutmann, H.T. and Ryan, R.J., Endocrinology, 102, 1874 (1978).

По вопросам, касающимся качества Набора «ЛГ-ИФА»,

следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:

105043, Москва, а/я 58,

тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru

интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,

к. б. н. Д. С. Кострикин

Instruction for use

A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF LH IN HUMAN BLOOD SERUM OR PLASMA

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of LH in blood serum or plasma.

This kit is designed for measurement of LH in blood serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 42 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Luteinizing hormone (LH) is produced in both men and women by the anterior pituitary gland in response to luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH or Gn-RH), which is released by the hypothalamus. LH, also called interstitial cell-stimulating hormone (ICSH) in men, is a glycoprotein with a molecular weight of approximately 30,000 daltons. It is composed of two noncovalently associated amino acid chains: alpha and beta.

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 on sequence of hormonal events along the gonado-hypothalamus-pituitary axis. During the cycle, LH level is low except for the middle of the cycle when its concentration may increase up to 5–10 fold. LH peak is preceded by a peak of Estradiol which occurs approximately 12 hours earlier. Ovulation occurs 12-120 hrs after LH peak. When the ovum is released, the corpus luteum is formed which secretes progesterone and estradiol, these latter exerting negative feedback effects on LH and FSH levels through hypothalamo-pituitary axis.

LH concentration in blood is subject to circadian rhythms; therefore blood sample for LH assay should always be taken at the same time of the day. Circadian variations of LH level are more pronounced in women depending of the stage of menstrual cycle: they become less frequent at the end of luteinic phase and less pronounced – at the end of follicular stage. Increased LH levels are found in primary dysfunction of gonadal glands, in amenorrhea caused by ovarian insufficiency, in Stein-Leventhal syndrome, after menopause. Increased concentrations of LH are also present during renal failure, cirrhosis, hyperthyroidism, and severe starvation.

Decreased LH concentrations are seen in dysfunction of hypophysis or hypothalamus, in galactorrhea-amenorrhea syndrome, in isolated decrease of gonadotropins, in isolated LH decrease; in neurotic anorexia, in patients with retardation of growth and sexual development, after intake of digoxin, phenothiazine, progesterone, estrogens.

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

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by specific murine monoclonal to β chain human LH-antibodies. Antigen from the specimen is captured by the antibodies coated onto the microwell surface. Second antibodies – murine monoclonal to α chain human LH/FSH/HCG, labelled with peroxidase enzyme, are then added into the microwells. After washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

4.1. For professional use only.

4.2. This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

4.3. INFECTION HAZARD: There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

4.4. Avoid contact with stop solution containing 5,0% H_2SO_4 . It may cause skin irritation and burns.

4.5. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

4.6. Do not use the kit beyond the expiration date.

4.7. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

4.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

4.9. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

4.10. Do not mix reagents from different lots.

4.11. Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

4.12. Do not pipette reagents by mouth.

4.13. Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

4.14. Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

4.15. The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

5.1. Contents of the Kit

5. KIT COMPONENTS

Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components
1	LH EIA strips, 8x12 wells	1	pcs		until exp.date
2	polystyrene microwells coated with murine monoclonal to β chain human LH Calibrator set, 0.8 ml each, preservative – 0,01% Bronidox L, 0,01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one-hydrochloride; also contains red dye zero calibrator C1 – 2 ml. The set contains 5 calibrators: 0; 5; 25; 50; 100 IU/l	5	pcs	red (C1 – colourless)	2 months
3	Control serum (0.8 ml)	1	pcs	colourless	2 months
4	Conjugate, 11 ml	1	pcs	red	until exp.date
5	Substrate solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
6	Washing solution concentrate 21x, 22 ml	1	pcs	colourless	Concentrate – until exp.date Diluted washing solution – 1 month at +2...+8 °C or 5 days at RT
7	Stop solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
8	Plate sealing tape	2	pcs		N/A
9	Instruction LH EIA	1	pcs		N/A
10	QC data sheet LH EIA	1	pcs		N/A

5.2. Equipment and material required but not provided

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25–250 µl;
- Dry thermostat for 37 °C ±0.1 °C;
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0

5.3. Storage and stability of the Kit

Store the whole kit at +2...+8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells **TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED)** to minimize exposure to moisture.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at +2...+8 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

7. TEST PROCEDURE**7.1. Reagent Preparation**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21 dilutions in distilled water.

7.2. Procedural Note:

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

7.3. Assay flowchart

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

7.4. Assay procedure

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 12 wells for the calibrators CAL 1-5 and control samples CONTROL and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	If suggested analyte concentration in the sample exceeds the highest calibrator; additionally dilute this sample accordingly, using (zero calibrator). Use of other buffers or reagents for sample dilution may lead to incorrect measurement.
3	Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells.
4	Pipet 50 µl of calibrators CAL 1-5, control samples CONTROL and unknown samples into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
5	Incubate 60 minutes at 37 °C.
6	Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate (BUF WASH 21X) by distilled water. Wash the strips 5 times.
7	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells
8	Incubate 10-20 minutes at +18...+25 °C
9	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
10	Measure OD (optical density) at 450 nm.
11	Set photometer blank on first calibrator
12	Apply point-by-point method for data reduction.

8. QUALITY CONTROL

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.

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 federal, state, and local 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.

9. CALCULATION OF RESULTS

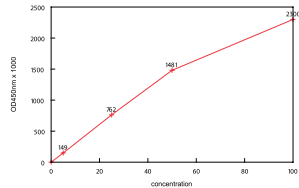
9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

9.2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus LH concentration.

9.3. Determine the corresponding concentration of LH in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.

9.4. Below is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!

Calibrators	Value	Absorbance Units (450 nm)
CAL 1	0 IU/l	0.09
CAL 2	5 IU/l	0.24
CAL 3	25 IU/l	0.85
CAL 4	50 IU/l	1.57
CAL 5	100 IU/l	2.39



10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for LH. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below). NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

Sex, age	Units, IU/l	
	Lower limit	Upper limit
Children under 11 yrs	1.0	5.0
Males	1.5	9.0
Females		
Menstrual cycle:		
follicular phase	2.0	9.5
luteinic phase	0.5	17
ovulation	10.0	45
post menopausal	5.0	57

11. PERFORMANCE CHARACTERISTIC

11.1. Analytical specificity / Cross reactivity

Analyte	Cross-reactivity, % wt/wt
HCG	<0.1
FSH	<0.1
TSH	<0.1

11.2. Analytical sensitivity

Sensitivity of the assay was assessed as being 0.3 IU/l.

11.3. Linearity

Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different LH concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110%.

11.4. Recovery

Recovery was estimated by assaying 5 mixed samples with known LH concentrations. The recovery percentages ranged from 90 to 110%.

12. LITERATURE

1. Pierce, J.G. and Parsons, T.F. Glycoprotein hormones: Structure and Function, Annual Rev. Biochem., 50, 465-495 (1981).
2. Harris, G.W. and Naftolin, The Hypothalamus and Control of Ovulation, Brit. Med. Bullet., 26, 1-9 (1970).
3. Knobil, E., The Neuroendocrine Control of the Menstrual Cycle, Rec. Prog. Horm Res., 36, 52...+88 (1980).
4. Jeffcoate, S.L., Clinics in Endocrinol. Metab., 4, 521-543 (1975).
5. Whitely, R.J., Keutmann, H.T. and Ryan, R.J., Endocrinology, 102, 1874 (1978).

