

Gonadotropin LH kit

ELISA Testkit zur quantitativen Bestimmung des Luteinisierenden Hormons in humanem Blutserum
(*Gebrauchsanweisung: Seite 4*)

Enzyme immunoassay for quantitative determination of luteinizing hormone in human serum
(*Instructions for use: page 28*)

Manueller Test / Manual test
Automatisierter Test / Automated test

Abschnitt / Section 13
Abschnitt / Section 14

IVD

Gonadotropin LH Kit
(Manueller Test)
Gonadotropin LH kit
(manual test)



96 Untersuchungen
96 tests

21-05

REF

Gonadotropin LH Kit
(Automatisierter Test für
"Alisei")
Gonadotropin LH kit
(automated test for "Alisei")









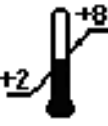





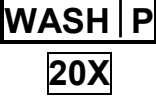









96 Untersuchungen
96 tests

21-05 A

REF

1.KENNZEICHEN / SYMBOLS LEGEND

	In-vitro Diagnostika In vitro diagnostic medical device		EG-Konformitätserklärung EC Declaration of conformity
	Bestellnummer Catalogue number		Chargenbezeichnung Batch code
	Verwendbar bis Use by		Hersteller Manufacturer
	Herstellungsdatum Date of manufacture		Gebrauchsanweisung beachten Consult operating instructions
	Temperaturbegrenzung Temperature limitation		Biogefährdung Biological risks
	Auflösen mit angegebenem Volumen Reconstitute with specified volume of liquid		Konjugat Conjugate
	Beschichtete Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) Coated microplate (96 wells)		Substrat Substrate
	Waschlösung, 20x konzentriert Wash solution, 20X concentrated		Stopplösung Stop solution
	Kalibratoren Calibrators		Deionisiertes, destilliertes Wasser Deionized or distilled water
	Kontrolle Control		Optische Dichte Optical density
	Reizend Irritant		Ausreichend für <n> Prüfungen Contains sufficient for <n> tests
Warning			

2. VERWENDUNGSZWECK

Der **Gonadotropin LH Testkit** ist für die **quantitative Bestimmung** des **Luteinisierenden Hormons (LH)** in humanem Blutserum bestimmt.

Der Testkit ist in zwei Variationen erhältlich:

REF 21-05 Für den manuellen Gebrauch

REF 21-05 A Für den Gebrauch mit ELISA-Automat "Alisei", hergestellt durch die Firma Next Level S.r.l.

Die Gebrauchsanweisungen befinden sich:

Abschnitt 13 Manueller Test

Abschnitt 14 Automatisierter Test "Alisei"

Anmerkung 1: *Die Konzentrationswerte der Kalibratoren können bei manuellem und automatisiertem Testkit variieren.*

Anmerkung 2: *Wir garantieren verlässliche Testergebnisse bei folgender Anwendung der Testkits*

REF 21-05 A nur für ELISA-Automat "Alisei"

REF 21-05 nur für den manuellen Gebrauch.

Bei Verwendung einer nicht vordefinierten Methode ist der Anwender dafür verantwortlich, sicherzustellen, dass diese für ELISA-Kits angemessen getestet wurde.

LH ist ein Glykoprotein mit einer Molekularmasse von ca. 30 000 Da, das aus den zwei Untereinheiten Alpha und Beta besteht. LH wird im Hypophysenvorderlappen gebildet und stimuliert die Testosteron-Synthese in den Hoden. Bei Frauen reguliert das LH zusammen mit anderen Hormonen den Menstruationszyklus.

Ein hoher LH-Wert wird bei Patienten mit verschiedenen Formen des Hypogonadismus (primäre Eierstock- und Hodeninsuffizienz, polyzystischen Ovarien, Menopause usw.), sowie bei Niereninsuffizienz und Zirrhose festgestellt.

Eine Verminderung des LH-Levels kann zur Sterilität in beiden Geschlechtern führen und ist im Falle einer Funktionsstörungen des Hypothalamus oder des Hypophysenvorderlappens zu beobachten.

Die Bestimmung des LH-Wertes ist hilfreich bei der Diagnose der Menopause, der genauen Bestimmung der Ovulationszeit und das Überwachen endokriner Therapien.

3. TESTPRINZIP

Der **Gonadotropin LH Testkit** ist ein "Sandwich"-Typ des Festphasen-Enzymimmunoassay, basierend auf zwei monoklonalen Antikörpern, die spezifisch an unterschiedliche Epitope der β -Untereinheit des LH-Moleküls binden. Einer dieser Antikörper ist mit der Meerrettich Peroxidase (HRP) konjugiert, der zweite ist an die Innenfläche der Kavität gebunden. Die LH-Moleküle der Blutserumprobe binden sowohl den immobilisierten Antikörper als auch das Anti-LH-Peroxidase-Konjugat (Abb. 1).

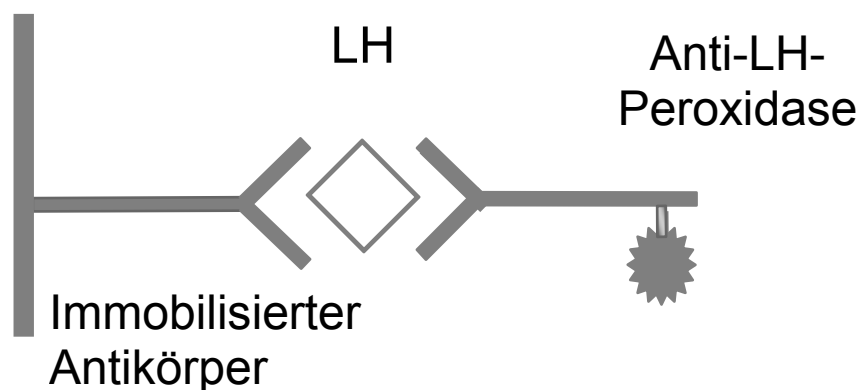


Abb. 1 Testschema

Beim Waschen der Kavitäten mit der Waschlösung werden alle ungebundenen Komponenten entfernt. Die Menge des gebundenen Konjugates ist direkt proportional zur LH-Konzentration in der Probe.

Während der Inkubation mit der TMB-Lösung entwickelt sich die Farbreaktion. Die Farbintensität ist direkt proportional zur LH-Konzentration der Probe. Die LH-Konzentration in der Patientenprobe wird mit einer Standardkurve, die mit dem Testkit erarbeitet wird, ausgelesen.

4. LAGERUNG UND STABILITÄT DES TESTKITS

Das Verfallsdatum des kompletten Testkits ist auf dem Außenetikett angegeben; das Verfallsdatum jeder einzelnen Testkomponente ist auf dem jeweiligen Etikett angegeben.

Der **Gonadotropin LH Testkit** ist nach dem Empfang bei +2...+8 °C in der Originalverpackung des Herstellers bis zum Verfallsdatum zu lagern. Eine Lagerung bei Temperaturen bis +25 °C ist maximal für 5 Tage zulässig.

Die Haltbarkeitsdauer des Kits beträgt 18 Monate.

Nach dem Öffnen ist der Testkit bei einer Lagerung von +2...+8 °C bis zu 12 Monate haltbar.

Wenn der Testkit in mehreren getrennten Experimenten verwendet wird, ist der Inhalt wie folgt zu lagern aber die Komponenten dürfen nie länger als bis zu ihrem Ablaufdatum verwendet werden:

- Die ungenutzten Mikrotiterplatten-Streifen: in einem fest verschlossenen Druckverschlussbeutel bei einer Temperatur von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;

- Fläschchen mit Konjugat, Kalibratoren und Kontrolle (gebrauchsfertig) bei +2...+8 °C für 12 Monate;
- Fläschchen mit Kalibratoren und Kontrolle (gelöst aus Lyophilisat): bei +2...+8 °C für maximal 6 Monate nach dem Öffnen;
- Fläschchen mit Substrat-Lösung: bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum, **lichtgeschützt**;
- Fläschchen der konzentrierten Trial-Lösung, des Waschlösung-Konzentrates und Stopplösung: bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Gebrauchsfertige Waschlösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25°C) für maximal 5 Tage oder bei +2...+8°C für maximal 4 Wochen;
- Gebrauchsfertige Trial-Lösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25°C) für maximal 5 Tage.

Beschädigte Testkits

Im Falle einer schweren Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss Astra Biotech GmbH schriftlich innerhalb einer Woche nach dem Empfang der Ware informiert werden. Der Gebrauch stark beschädigter Komponenten für einen Testlauf wird nicht empfohlen.

5. PROBENGEWINNUNG UND -LAGERUNG

Blut durch Venenpunktion entnehmen. Nach der Gerinnung wird das Serum durch Zentrifugation abgetrennt.

Es ist nicht zulässig, für eine Analyse Blutplasma, hämolysiertes (hell rot) oder lipämisches (milchig) Serum sowie Natriumazid-haltige Serumproben zu benutzen.

Die Proben sind bei +2...+8 °C nicht länger als 5 Tage zu lagern. Bei Notwendigkeit einer dauerhaften Aufbewahrung wird empfohlen, die Probe zu aliquotieren und bei Temperatur von ≤ -20 °C gefroren zu lagern. Ein wiederholtes Einfrieren ist zu vermeiden.

6. REFERENZWERTE

Mit Hilfe des **Gonadotropin LH Testkits** wurden Blutserumproben, die von 9-11 Uhr morgens bei gesunden 19-65 Jährigen entnommen wurden, untersucht. Die ermittelten Werte sind in folgender Tabelle dargestellt. Der angegebene Bereich dient jedoch nur als eine Orientierungshilfe.

Gruppe	n	Mittelwert (mIU/ml)	Bereich (mIU/ml)
<i>Frauen</i>			
Normal menstruiierend (19–35 Jahre)	120		
Follikelphase		4,2	1,1–8,7
Zyklusmitte		32,0	13,2–72
Lutealphase		5,3	<0,9–14,4
Postmenopause (49–65 Jahre)	15	19,3	18,6–72
<i>Männer (21–39 Jahre)</i>	40	3,9	0,8–8,4

Es wird ausdrücklich empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Referenzbereich für die LH–Normkonzentrationen bestimmt.

7. QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, Kontrollproben entsprechend der nationalen und regionalen Vorschriften zu benutzen. Der Einsatz der Kontrollproben sichert die Tag-zu-Tag Gültigkeit der Ergebnisse.

8. REAGENZIVORBEREITUNG

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) gebracht und gründlich gemischt werden.

MP Mikrotiterplatte

Die Verpackung mit der **Mikrotiterplatte** vor der Öffnung mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) lagern und anschließend wie folgt vorbereiten:

Notwendige Anzahl der Streifen in den Rahmen einsetzen. Die unbenutzten Streifen in einen Druckverschlussbeutel legen und gut verschließen.

CAL **CONTROL** Kalibratoren und Kontrolle

Flüssige Kalibratoren und die flüssige Kontrolle sind gebrauchsfertig. Die lyophilisierten Kalibratoren und die Kontrolle wie folgt vorbereiten:

- Durch leichtes Klopfen auf den Deckel den Feststoff vom Flaschenrand lösen.
- Die Fläschchen vorsichtig öffnen und die Deckelkappen umgedreht auf eine trockene und saubere Oberfläche legen.

- 0,5 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser jeweils in die Flaschen der Kalibratoren und der Kontrolle pipettieren, diese wieder mit dem jeweiligen Deckel verschließen und 10 Minuten bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) ohne Mischen inkubieren.

Danach unter Vermeidung einer Schaumbildung sorgsam rühren bis der Feststoff komplett gelöst ist. Weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur unter periodischem Schütteln inkubieren. Es darf kein Feststoff im Deckel oder an den Wänden der Fläschchen zurückbleiben.

WASH P Waschlösung

Zubereitung der benötigten Menge der **Waschlösung** durch 20fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem oder deionisiertem Wasser:

5 ml **WASH P** **20X** + 95 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

SUB **Substrat** vor direktem Licht schützen.

9. PROBENVORBEREITUNG

Proben auf Raumtemperatur bringen und sorgfältig mischen, um Homogenität zu erreichen.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

10.1 Kalibrierung:

Der **Gonadotropin LH Testkit** wurde gegen den internationalen Standard der WHO 68/40 kalibriert.

10.2 Spezifität:

Laut den Produktspezifikationen der Zulieferer überschreitet die Kreuzreaktivität der beiden monoklonalen Anti-LH-Antikörper nicht 0,3% mit FSH, TSH und nicht 0,1% mit hCG.

10.3 Analytische Sensitivität:

Die analytische Sensitivität des **Gonadotropin LH Testkits**, d.h. die minimale Konzentration, die sich vom Kalibrator 0 sicher unterscheiden lässt, beträgt 0,25 mIU/ml. Zur Ermittlung wurde der Mittelwert einer 10fach-Bestimmung der OD des Kalibrators 0 unter Berücksichtigung der Standardabweichung (+ 2 SD) gebildet.

10.4 Messbereich:

Der **Gonadotropin LH Testkit** (manuelles und Alisei Testkit) ist validiert für die Detektion eines LH-Konzentrationsbereiches von 0,25 -100 mIU/ml.

10.5 Hook-Effekt:

Der High-Dose-Hook-Effekt wurde durch Aufstocken des Kalibrator 0 mit Antigen bestimmt. Für den **Gonadotropin LH Testkit** wurde ein High-Dose-Hook-Effekt bei LH-Konzentrationen bis zu 50 000 mIU/ml nicht beobachtet.

10.6 Intra-Assay und Inter-Assay Varianz:

Um einen **Intra-Assay Variationskoeffizienten** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben, jeweils in 9fach-

Bestimmung untersucht. Die Testresultate sind in der Tabelle dargestellt:

Manuelles Testkit

Probe	Mittlere LH-Konzentration, mIU/ml	Intra-Assay VK	
		SD	VK, %
1	1,4	0,09	6,4
2	1,4	0,11	7,9
3	2,4	0,10	4,2
4	3,3	0,11	3,3
5	5,6	0,17	3,0
6	7,4	0,23	3,1
7	21,0	0,4	2,1
8	23,4	0,5	2,1

Alisei Testkit

Probe	Mittlere LH-Konzentration, mIU/ml	Intra-Assay VK	
		SD	VK, %
1	1.0	0,08	7,7
2	2.8	0,17	6,2
3	5.4	0,32	5,8
4	8.1	0,24	3,0
5	8.8	0,32	3,6
6	15.3	0,87	5,6
7	28.6	1,13	4,0
8	39.2	0,97	2,5

Um einen **Inter-Assay Variationskoeffizient** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben dreimal mit einem Intervall von einer Woche von verschiedenen Anwendern untersucht. Jede Probe wurde 9 Mal gemessen. Die Testergebnisse sind in der Tabelle dargestellt:

Manuelles Testkit

Probe	Mittlere LH-Konzentration, mIU/ml			Inter-Assay VK	
	1. Test	2. Test	3. Test	SD	VK, %
1	1,4	1,6	1,2	0,20	14,3
2	1,4	1,1	1,3	0,15	12,1
3	2,4	2,0	2,1	0,21	9,6
4	3,3	3,5	3,1	0,20	6,1
5	5,6	5,9	5,0	0,46	8,3
6	7,4	7,8	8,1	0,35	4,5
7	21,0	22,3	19,1	1,61	7,7
8	23,4	24,5	22,1	1,20	5,1

Alisei Testkit

Probe	Mittlere LH-Konzentration, mIU/ml			Inter-Assay VK	
	1. Test	2. Test		1. Test	2. Test
1	1,0	1,1	1,0	0,06	5,6
2	2,8	3,1	2,9	0,15	5,2
3	5,4	5,0	5,7	0,35	6,5
4	8,1	8,1	9,0	0,52	6,2
5	8,8	8,3	8,9	0,32	3,7
6	15,3	17,0	16,9	0,95	5,8
7	28,6	25,9	26,2	1,48	5,5
8	39,2	43,7	43,1	2,44	5,8

11. GRENZEN DER METHODE



Eine klinische Diagnose sollte nicht allein mit Hilfe der Ergebnisse einer einzelnen diagnostischen Methode erhoben werden. Zur Diagnosestellung sollten vom Arzt alle verfügbaren klinischen und Laborbefunde berücksichtigt werden.

12. VORSICHTSMAßNAHMEN



- **Der Testkit ist ausschließlich zum in vitro-Gebrauch bestimmt.** Um zuverlässige Testergebnisse zu erhalten, ist

die Arbeitsanleitung strikt einzuhalten. Diese Gebrauchsanweisung ist nur für den vorliegenden Testkit mit dem aufgeführten Inhalt gültig. Jeglicher Austausch der Kitkomponenten ist durch die CE-Regularien nicht gestattet.

- Der Testkit oder einzelne Kit-Komponenten dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Die Haltbarkeit der verdünnten Komponenten muss ebenfalls berücksichtigt werden.
- Das Mischen oder die gleichzeitige Verwendung von Reagenzien verschiedener Testchargen, ausgenommen Substrat, Stopp- und Waschlösung, ist nicht gestattet.
- Substrat, Stopplösung und Waschlösung anderer Hersteller nicht verwenden.
- Nur "P"-gekennzeichnete Astra Biotech–Waschlösung benutzen.
- Die Stopplösung ist eine 1 N Salzsäure (HCl–Lösung). Vermeiden Sie Haut- und Schleimhautkontakt. Bei Kontakt den betroffenen Bereich mit fließendem Wasser spülen und gegebenenfalls einen Arzt aufsuchen.
- Bitte folgende bekannte Verfahrensregeln beachten:
 - Reagenzien unmittelbar nach dem Waschen in die Kavitäten pipettieren;
 - Kontamination der Lösungen vermeiden;
 - Bei teilweiser Nutzung des Testkits nur benötigtes Volumen in ein gesonderten Behälter geben;
 - Nicht benutzte Reagenzien NICHT zurück in die ursprünglichen Original-Fläschchen füllen;
 - Direkte Sonneneinstrahlung während der Inkubation vermeiden;

- Reagenzien in gleicher Reihenfolge pipettieren, um Unterschiede in den Reaktionszeiten zwischen den Kavitäten zu vermeiden. Die gesamte Pipettierzeit für Kalibratoren, Kontrolle und Proben darf 15 Minuten nicht überschreiten;
- Die Temperatur der Inkubation aller immunologischen Reaktionen muss bei +37 °C liegen;
- Den Boden der Kavitäten nicht berühren;
- Kalibratoren müssen bei jedem Testlauf gemessen werden. Es wird außerdem empfohlen, die LH-Konzentration der Kontrolle immer zu bestimmen.
- Entfernen Sie die Klebeschutzfolie vorsichtig um eine Kontamination zu vermeiden und verwenden Sie dieselbe Klebeschutzfolie nicht erneut.
-
- Die TMB-Lösung sollte farblos sein. Eine helle Färbung der Lösung ist zulässig. Vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung des Substrates.
-  Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg (Hepatitis B surface Antigen) bzw. Antikörper gegen HIV („Human Immunodeficiency Virus“) und HCV (Hepatitis C Virus) ein negatives Ergebnis. Dennoch kann das Vorhandensein infektiöser Erreger durch keinen Test mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien und Proben sollten deshalb immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
-  Nach dem Gebrauch werden Streifen, Kalibratoren, Kontrollen, Proben und alle Verbrauchsmittel

(Reaktionsgefäße, Fläschchen, Handschuhe, Pipettenspitzen), die mit den Proben während der Bearbeitung oder Lagerung in Kontakt kamen, separat gesammelt und autoklaviert. Pipettenspitzen können anstelle des Autoklavierens durch Inkubation in desinfizierenden Substanzen sterilisiert werden. Nach der Sterilisation können alle Komponenten und Einmal-Artikel als nicht gefährlicher Müll behandelt werden. Andere Kitbestandteile werden auf konventionelle Weise entsorgt.

-  Während der manuellen Waschprozedur Überstände nicht in den Abfluss geben, sondern in einen Behälter mit Desinfektionsmittel.
-  Beim Umgang mit potentiell infektiösem Material müssen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:
 - Im Laborraum nicht rauchen, nicht trinken und nicht essen;
 - Schutzhandschuhe verwenden;
 - Nie mit dem Mund pipettieren;
 - Verspritzen von Flüssigkeiten vermeiden. Sollte doch Flüssigkeit vergossen worden sein, diese sofort aufnehmen und die verschmutzte Oberfläche desinfizieren
- Bei der Verwendung des Testkits müssen die Anforderungen der guten Laborpraxis (GLP) inklusive aller Richtlinien beachtet werden.



Der Testkit beinhaltet Reizstoffe (**CONJ**, **CAL**, **CONTROL**). Daher sollten folgende Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:

- P261 - Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden;
- P272 - Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen;
- P280 - Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen;
- P302+P352 - Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen;
- P333+P313 - Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen;
- P363 - Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen;
- P501 - Inhalt/Behälter den nationalen Vorschriften entsprechend der Entsorgung zuführen.

Die Vorsichtsmaßnahmen entsprechen der Verordnung EG Nr. 1272/2008.

13. MANUELLER TEST (REF 21-05)

13.1 Packungsinhalt

MP	Mikrotiterplatte: Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten), beschichtet mit monoklonalen Anti-LH-Antikörpern	1 Platte
CONJ	Konjugat: Lösung aus monoklonalen Anti- LH-Antikörpern konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP)	14 ml, gebrauchsfertig
0-5 CAL	LH Kalibratoren: Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter LH-Konzentration- 0; 2; 5; 25; 50; 100 mIU/ml (ungefähre Werte - verwenden Sie die Daten nicht für die Auswertung des Assays). Die Konzentrationen der Kalibratoren können sich zwischen Protokoll 1 und 2 unterscheiden. Die exakten Lot spezifischen LH-Konzentrationen sind im Quality Control Sheet angegeben..	6 Fläschchen mit je 0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
CONTROL	LH Kontrolle: Protein-Puffer oder Lyophilisat mit definierter LH-Konzentration. Der Konzentrationsbereich kann sich zwischen Protokoll 1 und 2 unterscheiden. Der Lot spezifische LH Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben	0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
SUB	Substrat (TMB-Lösung): 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml, gebrauchsfertig
WASH P 20X	Waschlösung P, 20x, konzentriert: Tensid in Salzlösung, ausreichend für	2x14 ml, konzentriert

	die Vorbereitung von 560 ml Lösung.	
STOP	Stopplösung: 1 N HCl-Lösung	14 ml, gebrauchsfertig
	Klebeschuttfolie	2x1 Folie (optional)

13.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- geeichte, verstellbare Einkanal-Pipetten mit Einweg-Pipettenspitzen;
- geeichte, verstellbare 8-Kanal-Pipette mit Einweg-Pipettenspitzen;
- Mikrotiterplatten-Inkubator (+37 °C) oder Mikrotiterplatten-Inkubator-Schüttler (+37 °C, 500-800 rpm);
- Equipment zum manuellen oder automatischen Waschen;
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten (450 nm);
- Vortexer;
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser;
- Messzylinder, Becherglas;
- Labor-Handschuhe;
- Behälter zum Pipettieren mit 8-Kanal-Pipette;
- Desinfektionsmittel;
- Absorbierendes Material (zum manuellen Waschen).

13.3 Testablauf

Der **Gonadotropin LH Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine Doppelbestimmung von 40 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und 1x Blank (=OD der TMB-Lösung).

13.3.1 Assay-Durchführung

Assay-Protokoll 1

(siehe: Assay-Schema für Assay-Protokoll 1, Abschnitt 13.5)

Anmerkung: *Dazugehörige Konzentrationen der Kalibratoren und Kontrollbereiche für das Assay-Protokoll 1 sind im Quality Control Sheet enthalten.*

Für alle Proben sollte eine Zweifachbestimmung durchgeführt werden.

- A. 100 µl Konjugat [CONJ]** in alle Kavitäten **außer A1-A2** (Blank) pipettieren.
- B. 20µl der Kalibratoren [CAL], Kontrolle [CONTROL]** und die vorbereiteten **Serumproben in Zweifachbestimmung** in entsprechende Kavitäten pipettieren. **Kavitäten A1-A2 bleiben frei (Blank).**

Anmerkung: Die Gesamtzeit der Pipettiertschritte darf 15 Minuten nicht überschreiten, da es somit zu einer erheblichen Variation der Inkubationszeit zwischen den Proben kommt und

das Testergebnis somit unzuverlässig sein kann.

Anmerkung: Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, nutzen sie diese jetzt um die Mikrotiterplatten zu verschließen.

C. 60 Minuten bei **+37 °C** unter Schütteln (**500 bis 800 rpm**) inkubieren.

Anmerkung: Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, entfernen sie diese nun vorsichtig von der Mikrotiterplatte.

D. 5x, wie unten beschrieben, waschen.

E. 100 µl Substrat SUB in jede Kavität pipettieren; entweder Streifen bei **Raumtemperatur** (+18...+25°C) **im Dunkeln** für **15-30 Minuten** (abhängig von der Farbintensität) oder für **10 Minuten** bei **+37 °C** unter Schütteln (**500-800 rpm**) inkubieren.

F. 100 µl Stopplösung STOP in alle Kavitäten (auch Blank) in selber Reihenfolge und Geschwindigkeit wie das Substrat pipettieren und für **1-2 Minuten** bei **Raumtemperatur schütteln**.

G. Messen der **Optischen Dichte** bei **450 nm** innerhalb von **20 Minuten**.

13.3.2 Waschen

Es wird empfohlen, ein automatisches Mikroplatten-Waschgerät mit 5 Waschzyklen und einem jeweiligen Waschvolumen von 300 µl pro Kavität und Zyklus zu benutzen.

Die Waschprozedur kann ebenso manuell durchgeführt werden:

- Überstand aus den Kavitäten in einem Behälter mit Desinfektionsmittel verwerfen;

- 300 µl der vorbereiteten Waschlösung (Abschnitt 8) in jede Kavität geben, die Platte für 5-10 Sekunden sorgfältig schütteln und den Überstand verwerfen, 5 Mal wiederholen;
- Ausklopfen der Kavitäten auf einer saugfähigen Unterlage bis alle Flüssigkeit entfernt ist.

13.4 Datenverarbeitung

Bei Benutzung eines Photometers, welcher keine Nullstellung erlaubt, wird der OD-Wert der Kavitäten A1-A2 (Blank) von allen anderen OD-Werten vor weiterer Kalkulation subtrahiert. *Beispiel:*

OD (Kalibrator 5) gemessen = 2,28 und OD (Blank) = 0,06;

OD (Kalibrator 5) berechnet = $2,28 - 0,06 = \underline{\underline{2,22}}$

13.4.1 Daten Verlässlichkeit (OD_{450 nm})

Die Daten sollten folgende Kriterien erfüllen:

- Mittelwert der OD (der Kavitäten A1-A2) $\leq 0,100$;
- Mittelwert der OD des Kalibrators 5 $\geq 1,3$ (nach Blank Subtraktion);
- Konzentration der Kontrolle muss innerhalb des Bereiches liegen, welcher auf dem Quality Control Sheet angegebenen ist.

Sollten die gemessenen Daten die Bedingungen nicht erfüllen, werden die Resultate als unzulässig betrachtet und der Test sollte wiederholt werden.

13.4.2 Quantitative Bestimmung

Eine spezialisierte Software zur quantitativen Bestimmung wird empfohlen.

Die Mittelwerte der OD der Kalibratoren bei 450 nm werden gegen deren jeweilige LH-Konzentration mittels **4PL oder 5PL Näherung** (Abb. 2 Typische Standardkurve) aufgetragen. Die LH-Konzentration der Serumproben wird mit Hilfe der Standardkurve berechnet.

Eine Extrapolation der Standardkurve für LH-Konzentrationswerte, die die Konzentration des Kalibrators 5 überschreiten (etwa 100 mIU/ml), ist nicht zulässig.

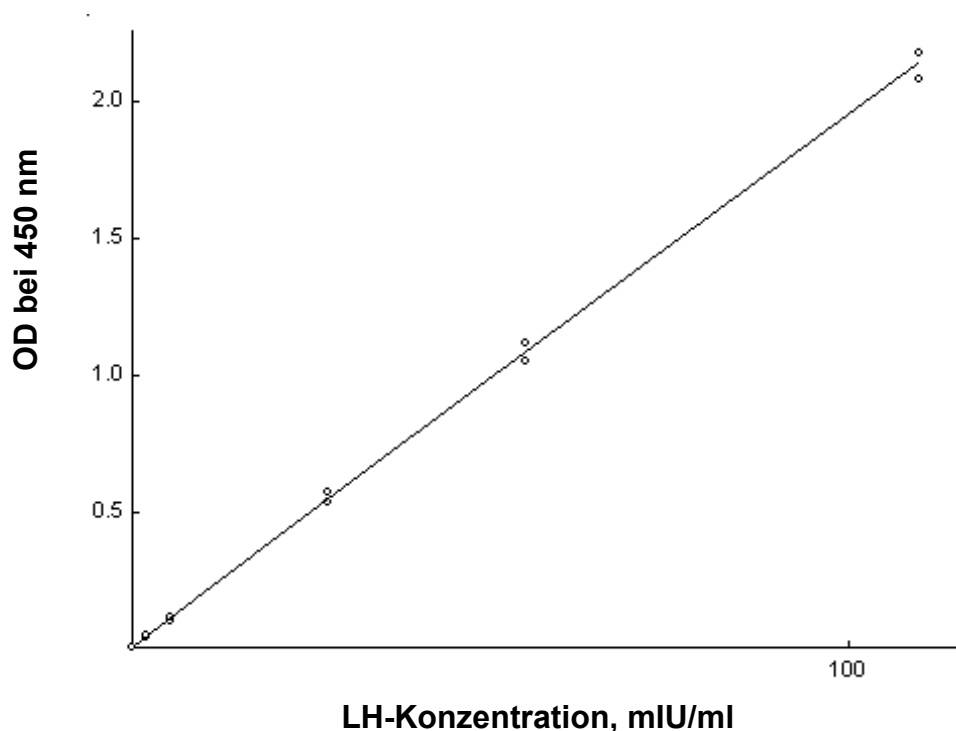


Abb.2 Typische Standardkurve

Beispielstandardkurve! Nicht zur Auswertung benutzen

13.5 Assay-Schema zum Assay-Protokoll 1

Kavität \ Reagenzien	«Blank»	CAL CONTROL	Proben
	CONJ	–	100 µl
CAL CONTROL	–	20 µl	–
Proben	–	–	20 µl
Inkubation No.1	60 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
WASH P (verdünnt)	5 x 300 µl		
SUB	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubation No.2	15–30 Min, +18...+25 °C, im Dunkeln		
	10 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
STOP	100 µl	100 µl	100 µl
Rühren	1-2 Min, +18...+25 °C		
OD-Messung	450 nm		
Berechnung	Spezielle Software		

14. AUTOMATISIERTER TEST (REF 21-05 A)

14.1 Packungsinhalt

MP	Mikrotiterplatte: Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten), beschichtet mit monoklonalen Anti-LH - Antikörpern	1 Platte
CONJ	Konjugat: Lösung mit monoklonalen Anti-LH-Antikörpern konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP)	14ml, gebrauchsfertig
0-5 CAL	LH Kalibratoren: Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter LH-Konzentration- 0; 2; 5; 25; 50; 100 mIU/ml(ungefähre Werte- bitte nicht für die Auswertung von realen Testdaten verwenden). Für Lot spezifische LH-Konzentrationen siehe Werte im Quality Control Sheet.	8 Fläschchen mit je 0,5 ml, CAL 1, 4 – 2 × 0,5 ml; CAL 0, 2, 3, 5 – 1 × 0,5 ml; gebrauchsfertig oder lyophilisiert
CONTROL	LH Kontrolle: Protein-Puffer oder Lyophilisat mit definierter LH-Konzentration. Der LH-Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben.	2x 0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
WASH P 20X	Waschlösung P, 20x konzentriert: Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 1000 ml Lösung.	50 ml, konzentriert
SUB	Substrat (TMB-Lösung): 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml, gebrauchsfertig
STOP	Stopplösung: 1 N HCl-Lösung	19 ml, gebrauchsfertig
TRIAL 5000X	Trial-Lösung, 5000X konzentriert: Reinigungslösung	Ist separat zu bestellen

Anmerkung: Extra Fläschchen der **CAL** 1 und 4 sowie **CONTROL** werden zur Rekalibrierung der Referenz-Standardkurve bereitgestellt. Genauere Informationen sind in der Gebrauchsanleitung des ELISA-Automaten "Alisei" zu finden.

14.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- ELISA-Automat "Alisei";
- Polypropylen Röhren 12x75, Volumen: 5,5 ml;
- **TRIAL 5000X** Trial-Lösung, 5000x konzentriert*;
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser,
- Laborhandschuhe.

14.3 Testverfahren

Der **Gonadotropin LH Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine Einzelbestimmung von 88 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und für die Bestimmung des Blank (=OD der TMB-Lösung).

14.3.1 Reagenzienvorbereitung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und gründlich gemischt werden.

Anmerkung: *Vorbereitung der anderen Reagenzien siehe Abschnitt 8.*

TRIAL Trial-Lösung zum Reinigen der gerät-internen Hydraulikleitungen und Nadeln des ELISA-Automaten.

Zubereitung der benötigten Menge der Trial-Lösung vor der Analyse durch 5000fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem oder deionisiertem Wasser:

2 ml **TRIAL 5000X** + 9998 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden

* Reagenz ist nicht Teil des Kits und kann separat bezogen werden.

14.3.2 Testablauf des automatisierten Tests

Bei Benutzung des ELISA-Automaten „Alisei“ ist die entsprechende Gebrauchsanweisung des Gerätes zu verwenden. Die Durchführung des Enzymassays mit „Alisei“ ist komplett automatisch: Pipettieren der Reagenzien, Waschschritte, Inkubation, OD-Messung und Analyse der Testergebnisse. Das Programm zur Berechnung der LH-Konzentration ist im Gerät ebenfalls enthalten.

14.4 Datenverarbeitung

14.4.1 Daten Verlässlichkeit (OD_{450 nm})

Siehe Kriterien des Abschnittes **13.4.1**.

14.5 Vorsichtsmaßnahmen

- Bei mehrfacher Nutzung des Testkit in einem ELISA-Automaten müssen die Reagenzien aufgrund der Verdunstung unmittelbar nach Beenden des Pipettiervorganges aus dem Automaten genommen werden, um einen möglichen Verlust durch Verdunstung zu vermeiden. Die Reagenzien sind in den Kühlschrank zu stellen.
- Die Rekalibrierung anhand der Standardkurve eines Testkits mit anderer Lotnummer ist nicht zulässig.

2. INTENDED USE

The **Gonadotropin LH** kit is provided for the **quantitative determination of luteinizing hormone (LH) in human serum**.

This test has 2 complete sets:

REF 21-05 for manual use,
REF 21-05 A must be used with ELISA automatic instrument “Alisei” manufactured by NEXT Level S.r.l. hereinafter referred to as analyser “Alisei”.

Instructions for use:

Section 13 for manual test,
Section 14 for *analyser* “Alisei”.

Note 1: *Take into account that calibrators’ nominals can be different for manual and automatic test kits.*

Note 2: *We guarantee applications of test*

REF 21-05A *only on analyser “Alisei”,*
REF 21-05 *only for manual use.*

While using non predefined methods of use, it is under end user responsibility, to make sure that it was appropriately tested for ELISA kits.

LH is a glycoprotein with a molecular mass of about 30 000 Da that consists of two subunits – α and β . LH is secreted by frontal lobe of pituitary gland and stimulates testosterone synthesis in testicles. Together with other hormones, LH regulates the menstrual cycle in females.

Increased LH levels are observed in patients with different forms of hypogonadism (primary ovary or testicle insufficiency, polycystic ovary, menopause etc)

renal insufficiency and cirrhosis. Decreased LH levels that may lead to sterility in both sexes are observed in the case of dysfunctions in hypothalamus or frontal lobe of pituitary gland.

LH measurement is useful for the diagnosis of menopause, exact determination of ovulation time and for endocrine therapy monitoring.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Gonadotropin LH kit** is a “sandwich” type of solid-phase enzyme immunoassay, based on two monoclonal antibodies that are specific for different epitopes of LH β -subunit. One of these antibodies is conjugated with horseradish peroxidase (HRP); the other is coated onto the inner surface of microwells. LH molecules from the serum sample bind to both immobilized antibody and anti-LH-peroxidase conjugate (Fig.1).

Then the wells are washed with wash solution to remove any material not bound on the inner surface of the wells. Quantity of the bound conjugate is directly proportional to LH level in the sample.

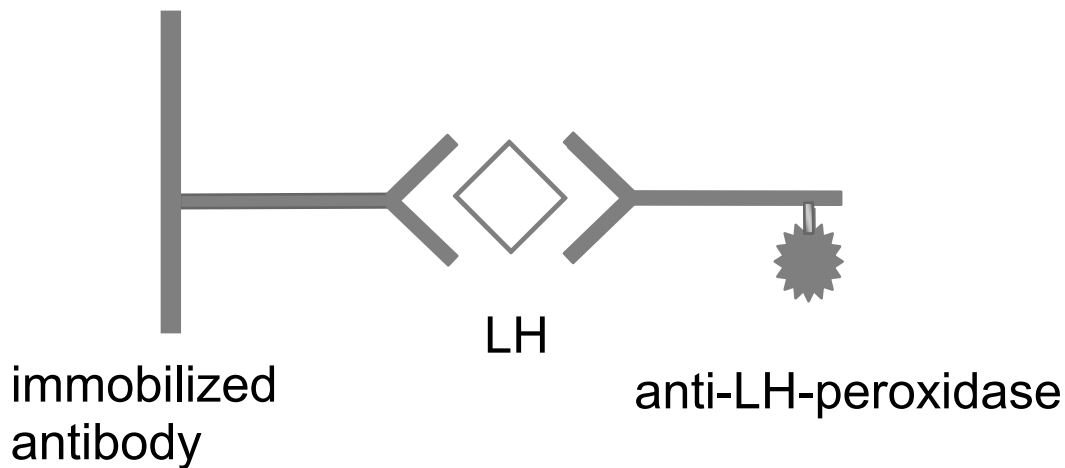


Fig. 1. Assay scheme

During the incubation with TMB solution the colour is developing. The intensity of the colour is directly proportional to LH concentration in specimens.

LH concentration in the patient sample is read from a standard curve that is processed in each assay.

4. STORAGE AND STABILITY OF THE KIT

The expiration date of the kit is printed on the box label; the expiration date for each component is printed on the respective label.

Gonadotropin LH kit should be stored at +2...+8 °C upon receipt, preferably in the original kit box, until the expiration date. Storage at +25 °C is allowed but for no more than 5 days.

Shelf life of the kit is 18 months.

After initial opening, the kit is stable for 12 month if stored at +2...+8 °C.

If used in several separate experiments, after initial opening kit contents should be stored as follows but never used longer than the expiration date::

- unused strips: in a firmly closed resealable zipper bag at +2...+8 °C ;
- vials with conjugate, calibrators and control (ready-to-use): at +2...+8 °C for 12 month; vials with calibrators and control (reconstituted): at +2...+8 °C for no more than 6 months after opening;
- vial with substrate: at +2...+8 °C until the expiration date, protected from light;
- vials with concentrated Trial, concentrated wash solution and stop solution: at +2...+8 °C until the expiration date;
- wash solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days or at +2...+8°C for no more 4 weeks in a firmly closed bottle;
- Trial solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days in a firmly closed bottle.

Damaged Test Kits

In case of any severe damage of the test kit or components, Astra Biotech GmbH has to be informed in writing, during one week after receiving the kit. Usage of severely damaged single components for a test run is not recommended.

5. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

Collect blood by venipuncture. After clotting, the serum is separated by centrifugation.

Do not use plasma, haemolyzed (bright red) or lipaemic (milky) serum samples as well as samples containing sodium azide as preservative.

Store serum samples at +2...+8 °C for no more than 5 days. Aliquot and freeze the samples for a longer storage (≤ -20 °C). Avoid repeated freezing.

6. EXPECTED VALUES

Serum samples collected between 9 and 11 a.m. from apparently healthy people at the age of 19-65, were assayed with Gonadotropin LH kit. The results are given in the table below. These limits should be considered as guidelines only.

Group	N	Mean (mIU/mL)	Range (mIU/mL)
<i>Females</i>			
Normally menstruating (19–35 years old)	120		
follicular phase		4.2	1.1–8.7
midcycle peak		32.0	13.2–72
luteal phase		5.3	<0.9–14.4
Postmenopausal (49–65 years old)	15	39.3	18.6–72
<i>Males (21–39 years old)</i>	40	3.9	0.8–8.4

It is highly recommended for each laboratory to determine its own reference range of LH concentrations.

7. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to the state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

8. REAGENT PREPARATION

Allow all the reagents to reach room temperature, and then thoroughly stir.

MP Microplate

Keep the **microplate** at room temperature (+18...+25 °C) for at least 30 minutes before opening the bag. Place required number of strips onto strip holder. Place unused strips into the resealable zipper bag and reseal duly.

CAL **CONTROL** Calibrators and Control

Liquid calibrators and control are ready to use.

Prepare lyophilized calibrators and control as follows. Gently tap on the vial caps to knock off all the dry matter. Open the vials and carefully place the caps upside down on the clean dry surface. Add 0.5 mL of distilled or deionized water to each vial with lyophilized calibrators and control, close vials with the corresponding caps and leave for 10 min at room temperature (+18...+25 °C) without stirring. Then stir gently avoiding foaming, until the dry matter is completely dissolved.

Leave for another 10 minutes at room temperature stirring gently periodically. Make sure that no dry matter is left on the caps and walls of the vials.

WASH P Wash solution

Prepare required volume of **wash solution** by dilution of the concentrate 20-fold with distilled or deionized water. For example:

5 mL **WASH P** **20X** + 95 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

SUBSubstrate

Protect **substrate** from direct light.

9. SAMPLE PREPARATION

Allow samples to reach room temperature. Stir samples gently in order to ensure homogeneity.

10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY

10.1. Calibration – Traceability:

Gonadotropin LH kit was calibrated against the WHO International Reference Preparation 68/40.

10.2. Specificity:

According to Product specifications provided by the supplier, cross-reactivity of both anti-LH monoclonal antibodies used in the assay with FSH and TSH does not exceed 0.3% and with hCG does not exceed 0.1%.

10.3. Analytical Sensitivity:

Analytical sensitivity of **Gonadotropin LH kit**, i.e. concentration that can be distinguished from zero calibrator, is 0.25 mIU/mL. It is defined as mean OD of 10 replicates of calibrator 0 plus 2SD.

10.4. Measurement Range:

Gonadotropin LH kits (manual and Alisei kits) were validated for measurement of LH concentration within the concentration diapason of 0.25 -100 mIU/mL.

10.5. Hook Effect:

High dose hook effect was determined by spiking calibrator 0 matrix with antigen. For **Gonadotropin LH kit** no high-dose hook effect was observed for LH concentrations up to 50 000 mIU/mL.

10.6 Intra- and Inter-Assay Variation:

For **Intra-Assay CV** determination 8 serum samples were assayed in 9 replicates each. The results are shown below.

Manual kit

Sample	Mean LH concentration, mIU/mL	Intra-Assay CV	
		SD	CV, %
1	1.4	0.09	6.4
2	1.4	0.11	7.9
3	2.4	0.10	4.2
4	3.3	0.11	3.3
5	5.6	0.17	3.0
6	7.4	0.23	3.1
7	21.0	0.4	2.1
8	23.4	0.5	2.1

Alisei kit

Sample	Mean LH concentration, mIU/mL	Intra-Assay CV	
		SD	CV, %
1	1.0	0.08	7.7
2	2.8	0.17	6.2
3	5.4	0.32	5.8
4	8.1	0.24	3.0
5	8.8	0.32	3.6
6	15.3	0.87	5.6
7	28.6	1.13	4.0
8	39.2	0.97	2.5

For **Inter-Assay CV** determination 8 serum samples were assayed 3 times by different operators with 1-week interval. Each specimen was assayed in 9 replicates. The results are shown below.

Manual kit

Sample	Mean LH concentration, mIU/mL			Inter-Assay CV	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	1.4	1.6	1.2	0.20	14.3
2	1.4	1.1	1.3	0.15	12.1
3	2.4	2.0	2.1	0.21	9.6
4	3.3	3.5	3.1	0.20	6.1
5	5.6	5.9	5.0	0.46	8.3
6	7.4	7.8	8.1	0.35	4.5
7	21.0	22.3	19.1	1.61	7.7
8	23.4	24.5	22.1	1.20	5.1

Alisei kit




Sample	Mean LH concentration, mIU/mL			Inter-Assay precision	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	1.0	1.1	1.0	0.06	5.6
2	2.8	3.1	2.9	0.15	5.2
3	5.4	5.0	5.7	0.35	6.5
4	8.1	8.1	9.0	0.52	6.2
5	8.8	8.3	8.9	0.32	3.7
6	15.3	17.0	16.9	0.95	5.8
7	28.6	25.9	26.2	1.48	5.5
8	39.2	43.7	43.1	2.44	5.8


11. LIMITATION OF THE METHOD

Any clinical diagnosis should not be based on the results of in vitro diagnostic methods alone. For diagnosis establishment, a physician is supposed to consider all available clinical and laboratory findings.

12. SAFETY PRECAUTIONS

- **This kit is for in vitro diagnostic use only.** Operator should follow the manual closely in order to ensure reliable data. The manual is valid for the present kit only, within the listed composition. Any substitution of kit components is not allowed by CE regulations.
- Do not use kit or its components after the expiration date indicated on the label. Take into account stability period for reconstituted reagents.
- Do not mix or use together reagents from different lots of the kit except substrate, stop solution and wash solution.
- Do not use substrate, stop solution and wash solution supplied by other vendors.
- Use only “P”-labeled Astra Biotech wash solution.
- Note that stop solution is 1 N HCl solution. Avoid contacts with skin and mucosa. In case of contact rinse affected area thoroughly with plenty of water and seek medical advice.
- Take into account the following common procedural notes:
 - always pipette reagents into wells immediately after washing procedure;
 - avoid contamination of the solutions;
 - in case of partial use of the kit, dispense only required volume of the reagent into the tray;
 - do not pour unused reagents back into the original vials;
 - avoid exposure to direct sunlight during incubations;
 - always pipette reagents in the same order to minimize reaction time differences between wells; the total dispensing time for the calibrators, control and samples must not exceed 15 min;

- the incubation temperature for all the immunological reactions must be kept at +37 °C;
- do not touch the bottom of the wells.
- calibrators should be measured in each separate assay. It is also recommended to measure each time LH concentration in the control.
- remove the adhesive foil carefully to avoid contamination and don't use the adhesive foil repeatedly.
-
- TMB solution should be colourless. Light colouring of solution is admissible. Avoid direct exposure of substrate to sunlight.
-  Source materials of human origin used for kit components preparation were tested and found negative for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV antibodies. However, none of known laboratory test guarantees absence of these viral agents. Therefore, all kit components and patient's samples should be handled as potentially hazardous.
-  After usage strips, calibrators, control, specimens and all consumables which contacted with specimens during handling, storage or assay (tubes, vials, gloves, pipette tips etc.) should be collected separately and sterilized by autoclaving. Instead of autoclaving pipette tips may be sterilized by disinfectant treatment. After sterilization all components and expendable materials may be utilized as non-dangerous garbage. Other components of the kit should be discarded into conventional garbage.
-  During manual washing procedure do not discard the contents of the wells directly to drainage. Use a container with disinfectant solution.

-  As the kit contains potentially hazardous material, the following precautions should be taken:
 - do not smoke, eat or drink while performing the assay;
 - always use protective gloves;
 - never pipette material by mouth;
 - in case of spilling, wipe up the spills promptly and wash affected area thoroughly using decontaminant.
- GLP including all general and individual regulations should be applied for the kit usage.



As the kit contains irritant (**CONJ**, **CAL**, **CONTROL**), the following precautions should be observed:

- P261 - Avoid breathing spray;
- P272 - Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace;
- P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection;
- P302+P352 - IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water;
- P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention;
- P363 - Wash contaminated clothing before reuse;
- P501 - Dispose of contents/container in accordance with national regulation.

Precautionary statements according to Regulation EC No 1272/2008.

13. MANUAL TEST (REF 21-05)

13.1 Material Provided

MP	Microplate: 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-LH monoclonal antibodies	1 pcs
CONJ	Conjugate: solution contains anti-LH monoclonal antibodies conjugated with HRP	14 mL, ready to use
0-5 CAL	LH calibrators: protein-based solution or lyophilized preparations containing known LH concentrations – 0; 2; 5; 25; 50; 100 mIU/mL (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). The concentrations of calibrators may be different for Assay Protocol 1 and 2. For lot specific LH concentrations see values in the Quality Control Sheet.	6 vials, 0.5 mL each; ready to use or lyophilized
CONTROL	LH control: protein-based solution or lyophilized preparation containing known LH concentration. The range of testosterone concentration may be different for Assay Protocol 1 and 2. For lot specific ranges of LH concentrations see values in the Quality Control Sheet.	0.5 mL, ready to use or lyophilized
SUB	Substrate (TMB solution): 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
WASH P 20X	Wash solution P, 20X concentrated: surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 560 mL of solution	2x14 mL, concentrated
STOP	Stop solution: 1 N HCl solution	14 mL, ready to use

	Adhesive foil	2x1 foil (optional)
--	----------------------	------------------------

13.2 Equipment and Materials Required but not provided

- 1-channel calibrated variable precision pipettes, with disposable tips;
- 8-channel calibrated variable precision pipette, with disposable tips;
- microplate incubator (+37 °C) or microplate incubator-shaker (+37 °C, 500-800 rpm);
- manual or automatic equipment for rinsing wells;
- calibrated microplate reader (450 nm);
- vortex tube mixer;
- deionized or distilled water;
- graduated beaker and cylinder of appropriate volume;
- latex or plastic gloves;
- trays for pipetting reagents with 8-channel pipette;
- disinfectant;
- absorbent material (for manual wash).

13.3 Test Procedure

Gonadotropin LH kit is designed for 96 tests. This is sufficient for 40 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in duplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

13.3.1 Assay Procedure

Note: *Please check in the Quality Control Sheet supplied with the kit for which Assay Protocol your kit has been validated. If your kit has been validated for Assay Protocol 1, please follow the Assay Protocol 1 described below. If your kit has been additionally validated for Assay Protocol 2, please consider the Supplement 1 to the Instructions for use provided with the kit.*

Assay Protocol 1

(see also Assay scheme to Assay Protocol 1, section 13.5)

Note: *Consider concentrations of calibrators and control range for Assay Protocol 1 provided in the Quality Control Sheet.*

All samples should be tested in duplicates.

- A.** Pipette **100 μ L conjugate [CONJ]** into each well, **except wells A1-A2 (blank);**
- B.** Pipette **20 μ L calibrators [CAL], control [CONTROL]** and prepared **patient's samples in duplicates**, into the respective wells; **Leave wells A1-A2 empty for blank!**

Note: *total time of dispensing must not exceed 15 minutes, otherwise the test result may be unreliable, because the time of incubation will substantially vary for different samples.*

Note: *If an adhesive foil is used, put it now onto the plate to seal the cavities.*

C. Incubate for 60 minutes at +37 °C while shaking (500–800 rpm).

Note: *If an adhesive foil is used, remove it now from the plate.*

D. Wash 5 times, as described below.

E. Pipette 100 µL substrate SUB into each well (including blank); incubate at room temperature (+18...+25 °C) in the dark for 15-30 minutes depending on the colour intensity or 10 minutes while shaking (500-800 rpm) at +37 °C.

F. Pipette 100 µL stop solution STOP into each well (including blank) in the same sequence and at the same speed as used for dispensing TMB substrate. Shake for 1–2 min at room temperature.

G. Read OD at 450 nm within 20 min.

13.3.2 Wash Procedure

It is advisable to use an automatic microplate washer set at 5 wash cycles and a volume of 300 µL of wash solution per well per cycle.

If an automatic washer is not available, the wash procedure can be carried out manually as follows:

- remove the contents of the wells into a container with disinfectant;

- dispense 300 µL of wash solution (section 8) into each well, shake the plate carefully for 5–10 sec and remove the contents of the wells; repeat 5 times;
- strike the wells sharply on absorbent material to remove any liquid residue.

13.3. Data Processing

If the reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in wells A1-A2, subtract mean OD value of wells A1-A2 from all OD values before further calculations.

Example:

OD (Cal 5) measured = 2.28 and OD (blank) = 0.06;

OD (Cal 5) calculated = $2.28 - 0.06 = \underline{2.22}$

13.4.1. Data Reliability (OD_{450 nm})

The data should meet the following criteria:

- average blank OD (in wells A1-A2) ≤ 0.100 ;
- average OD of Cal 5 ≥ 1.3 (after blank subtraction);
- control's concentration must fall within the acceptability range that is shown on the Quality Control Sheet..

If the data obtained do not meet the criteria, the results are considered unreliable and the test should be repeated.

13.4.1. Quantitative Determination

Specialized software for quantitative determination is recommended. Mean OD values of the calibrators at 450 nm versus their respective LH concentrations using **4PL or 5PL fit**

(Fig. 2 Typical standard curve). Calculate concentration of LH in samples using standard curve.

Any extrapolation of the standard curve to LH above the nominal value of the calibrator 5 (approximately 100 mIU/mL) is forbidden.

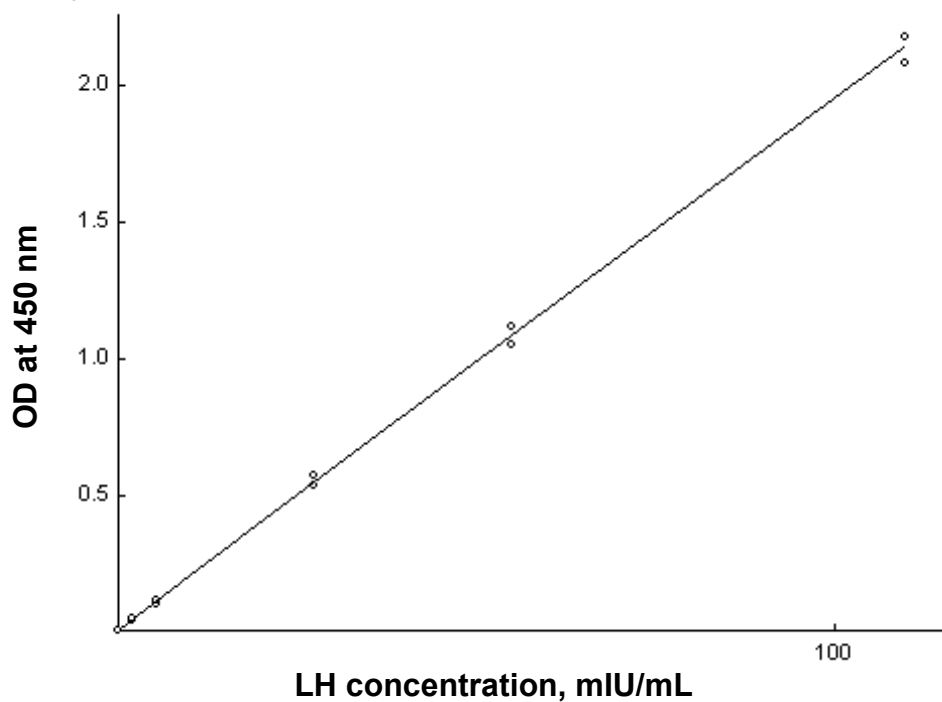


Fig. 2 Example of typical standard curve
Do not use for evaluation of real assay data!

13.5 Assay scheme to Assay Protocol 1

Reagents	Wells	CAL CONTROL		Samples
	«Blank»			
CONJ	–	100 µL		100 µL
CAL CONTROL	–	20 µL		–
Samples	–	–		20 µL
Incubation No.1	60 min, +37 °C, 500–800 rpm			
WASH P (diluted)	5 x 300 µL			
SUB	100 µL	100 µL		100 µL
Incubation No.2	15–30 min, +18...+25 °C, in the dark			
	10 min, +37 °C, 500–800 rpm			
STOP	100 µL	100 µL		100 µL
Stirring	1–2 min, +18...+25 °C			
OD measuring	450 nm			
Calculations	Corresponding software			

14. AUTOMATIC TEST (REF 21-05 A)

14.1. Material Provided

MP	Microplate: 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-LH monoclonal antibodies	1 pcs
CONJ	Conjugate: solution contains anti-LH monoclonal antibodies conjugated with HRP	14 mL, ready to use
0-5 CAL	LH calibrators: protein-based solution or lyophilized preparations containing known LH concentrations – 0; 2; 5; 25; 50; 100 mIU/mL. (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). For lot specific LH concentrations see values provided in the Quality Control Sheet	8 vials, 0.5 mL each: CAL 1, 4 – 2 × 0.5 mL; CAL 0, 2, 3, 5 – 1 × 0.5 mL; ready to use or lyophilized
CONTROL	LH control: protein-based solution or lyophilized preparation containing known LH concentration. For lot specific ranges of LH concentrations see Quality Control Sheet.	2 × 0.5 mL; ready to use or lyophilized
WASH P 20X	Wash solution P, 20X concentrated: surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 1000 mL of solution	50 mL, concentrated
SUB	Substrate (TMB solution): 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
STOP	Stop solution: 1 N HCl solution	19 mL, ready to use
TRIAL 5000X	Trial solution, 5000X concentrated: solution of detergent	It is delivered by separate order

Note: *Extra vials of **CAL** 1, 4 and **CONTROL** are provided for recalibration on reference calibration curve. For detailed information see instructions for use for analyser “Alisei”.*

14.2. Equipment and Materials Required but not provided

- Automatic analyser for ELISA kits on microplate (analyser “Alisei”);
- multipurpose polypropylene tubes 12x75 volume 5.5 mL;
- **TRIAL 5000X** Trial solution, 5000X concentrated*;
- deionized or distilled water;
- latex or plastic gloves.

14.3. Test Procedure

Gonadotropin LH kit is designed for 96 tests. This is sufficient for 88 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in monoplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

14.3.1. Reagent Preparation

Allow all the reagents to reach room temperature, and then thoroughly stir.

Note: *Preparation of other reagents see in section 8.*

TRIAL Working solution of Trial for washing internal hydraulic lines and needles of automatic analyser “Alisei”
Prepare required volume of **Trial solution** by dilution of the

* Reagent is not included in the kit, it is delivered in separate order.

concentrate 5000-fold with distilled or deionized water before analysis:

2 mL **TRIAL** **5000X** + 9998 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

14.3.2. Assay Procedure for Automatic Test

While using for the procedure automatic instrument for microplates “Alisei”, refer to its relative manual.

The analysis on EIA analyser “Alisei” is completely automatic: pipetting of reagents, washing, incubation, OD measurement, analysis of results. The program of calculation LH concentration is hardwired in analyser memory.

14.4. Data Processing

14.4.1. Data Reliability (OD_{450 nm})

See criteria in section **13.4.1.**

14.5. Safety precautions

- If kit for automatic analyser is used in several separate experiments it is necessary to take reagents from automatic analyser immediately after pipetting them in the wells of all plates because liquid evaporates from vials. Put the reagents in refrigerator;
- Recalibration using calibration curve, obtained with a kit of any other lot, is not permitted

August 26, 2019



Astra Biotech GmbH
Rudower Chaussee 29,
12489 Berlin, Germany
Telefon: +49 (0)30 74696509
E-Mail: info@astrabiotech.de
www.astrabiotech.de