



LHsp-IRMA

KIP1311

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

History

Summary of change:

Current Version:
230123
New logo



en

Read entire protocol before use.

LHsp-IRMA

I. INTENDED USE

Immunoradiometric assay kit for the *in vitro* quantitative measurement of human Luteinizing Hormone (LH) in serum.

II. GENERAL INFORMATION

A. Proprietary name : DIAsource LHsp-IRMA Kit

B. Catalog number : KIP1311: 96 tests

C. Manufactured by : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological Activity

Both LH and FSH are secreted by the basophil cells of the anterior pituitary as a result of gonadotropin releasing hormone (GnRH) secretion from hypothalamic cells.

In adults, LH and FSH hormones control gonadal functions; mainly gametogenesis and steroid secretion.

B. Clinical Application

The measurement of LH and FSH concentrations in serum is essential for investigating fertility and especially disorders of the hypothalamic/pituitary/gonadal axis.

The LHsp-IRMA is a one step assay which is specific for LH. This specific assay enables the measurement of LH concentrations in serum, irrespective of the presence of hCG from endogenous (pregnancy or ectopic tumor) or exogenous origin (*in vitro* fertilization program, with pregnyl injection).

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIAsource LHsp-IRMA is an immunoradiometric assay based on coated tube separation. Mabs1, the capture antibodies, are attached to the lower and inner surface of the plastic tube. Calibrators or samples added to the tubes will at first show low affinity for Mabs1. Addition of Mab2, the signal antibody labelled with ^{125}I , will complete the system and trigger the immunological reaction. After washing, the remaining radioactivity bound to the tube reflects the antigen concentration. The use of several distinct Mabs avoids hyperspecificity.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	Quantity 96 tests	Colour Code	Reconstitution
Tubes coated with anti LH (monoclonal antibodies)	2 x 48	blue	Ready for use
Anti-LH- ^{125}I (monoclonal antibodies) in TRIS-HCl Buffer with bovine serum albumin, sodium azide (<0.1 %) and inert red dye	1 vial 5.5 ml 700 kBq	red	Ready for use
Zero Calibrator in bovine serum with thymol	1 vial lyophil.	yellow	Add 2 ml distilled water
Calibrators 1-6 in bovine serum with thymol (see exact values on vial labels)	6 vials lyophil.	yellow	Add 1 ml distilled water
Wash solution (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	brown	Dilute 70x with distilled water (use a magnetic stirrer).
Controls 1 and 2 in human plasma with thymol	2 vials lyophil.	silver	Add 0.5 ml distilled water

Note:

1. Use the zero calibrator for sera dilutions.
2. 1 mIU of the calibrator preparation is equivalent to 1 mIU of 2nd IRP 80/552.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 50 μl , 100 μl , 500 μl , 1 ml and 2 ml. (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Tube shaker
6. 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
7. Aspiration system (optional).
8. Any gamma counter capable of measuring ^{125}I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators : Reconstitute the zero calibrator with 2 ml distilled water and the other calibrators with 1 ml distilled water..
- Controls : Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- Working Wash solution : Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kit components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution, calibrators and controls are stable for 3 days at 2-8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 3 months. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum must be kept at 2 – 8°C.
- If the test is not run within 24 hours, storage at -20°C is recommended.
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date. Do not mix materials from different kit lots. Bring all the reagents to room temperature prior to use. Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision. Respect the incubation times. Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

B. Procedure

1. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample. For determination of total counts, label 2 normal tubes.
2. Briefly vortex calibrators, controls and samples and dispense 100 μl of each into the respective tubes.
3. Dispense 50 μl of anti-LH- ^{125}I tracer into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
4. Shake the rack containing the tubes gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
5. Incubate for 1 hour at room temperature on a tube shaker (700 rpm).
6. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
7. Wash the tubes with 2 ml Wash Solution (except total counts). Avoid foaming during the addition of the Working Wash Solution.
8. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts).
9. Wash again the tubes with 2 ml Wash Solution (except total counts) and aspirate (or decant).
10. After the last washing, let the tubes standing upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
11. Count the tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean of duplicate determinations.
2. On semi logarithmic or linear graph paper plot the c.p.m. (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of LH (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points, reject the obvious outliers.
3. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
4. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

LHsp-IRMA		cpm	B/T (%)
Total count		246440	100
Calibrator	0.0 mIU/ml	207	0.1
	1.8 mIU/ml	533	0.2
	3.5 mIU/ml	1165	0.5
	9.9 mIU/ml	3821	1.6
	30.0 mIU/ml	12920	5.2
	97.0 mIU/ml	50053	20.3
	194.0 mIU/ml	93732	38.0

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection Limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations above the average counts at zero binding, was 0.2 mIU/ml.

B. Specificity

Cross-reactive hormones were added to a low and to a high LH value calibrator. The apparent LH response was measured.

added Hormone	LHsp CAL 1 mIU/ml		LHsp CAL 5 mIU/ml	
-	1.8		97	
FSH 300 mIU/ml	1.6		87	
hCG 300000 mIU/ml	2.4		85	
TSH 300 µIU/ml	3.6		100	

C. Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	$\bar{X} \pm S.D.$ mIU/ml	CV (%)	Serum	N	$\bar{X} \pm S.D.$ (mIU/ml)	CV (%)
A	10	6.6 ± 0.3	3.9	C	20	5.9 ± 0.5	8.0
B	10	49.6 ± 0.7	1.4	D	20	56.7 ± 1.9	3.4

D. Accuracy

RECOVERY TEST			
Sample	Added LH (mIU/ml)	Recovered LH (mIU/ml)	Recovery (%)
1	0.5	0.7	130
	1.5	1.8	117
	5	4.5	89
	14	12.7	90
	46	46.1	100
2	0.5	0.7	140
	1.5	1.3	87
	5	4.7	94
	14	12.9	92
	46	43.8	95

DILUTION TEST			
Sample	Dilution	Theoretical Concent. (mIU/ml)	Measured Concent. (mIU/ml)
1	1/1	-	79.7
	1/2	39.9	41.1
	1/4	19.9	19.9
	1/8	10.0	10.1
	1/16	5.0	5.3
	1/32	2.5	2.2
2	1/1	-	121.0
	1/2	60.5	53.0
	1/4	30.3	27.9
	1/8	15.1	14.9
	1/16	7.6	7.8
	1/32	3.8	3.8

Samples were diluted with zero calibrator.

E. Time Delay

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the calibrator has been added to coated tubes.

TIME DELAY		
	0'	30'
Sample 1 (mIU/ml)	2.2	2.3
Sample 2 (mIU/ml)	4.8	5.4
Sample 3 (mIU/ml)	53.6	54.6

F. Hook effect

A sample spiked with LH up to 1700 mIU/ml gives a signal above the highest calibrator concentration.

XIV. LIMITATIONS

- Specimens from patients who have received preparations of mouse monoclonal antibodies for diagnosis or therapy may contain human anti-mouse antibodies (HAMA). Such specimens may show either falsely elevated or depressed values when tested with assay kits which employ mouse monoclonal antibodies.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with *in vitro* immunoassays. Patients routinely exposed to animals or animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed in case of the presence of heterophilic antibodies. Carefully evaluate the results of patients suspected of having these antibodies. If results are not consistent with other clinical observations, additional information should be required before diagnosis.

XV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises

XVI. REFERENCE INTERVALS

The values provided below are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.
The range is expressed as 2.5% to 97.5% percentiles.

Identification	Number of subjects	Mean (mIU/ml)	Range (mIU/ml)
Children (0 to 12 years)			
Boys	20	0.2	0.0 – 1.4
Girls	20	0.4	0.0 – 0.9
Pubers (12 to 18 years)			
	18	2.9	0.1 – 10.6
Adult males			
	69	2.7	1.0 – 5.3
Women			
Ovulatory cycles			
- Follicular phase (day -12 to -6)	34	4.3	0.8 – 10.4
- Ovulatory peak (day 0)	49	19.6	2.9 – 41.1
- Luteal phase (day +6 to +12)	63	3.3	0.5 – 7.6
Postmenopausal	53	31.2	14.4 – 52.8

XVII. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For in vitro diagnostic use only.

This kit contains ^{125}I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.

This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

XVIII. BIBLIOGRAPHY

- CLARKE J.J., CUMMINS J.T. (1987)
Pulsatility of reproductive hormones: physiological basis and clinical implications.
Baillière's Clin. Endocrinol. Metab., 1:1
- FILICORI M., SANTORO N., MERRIAN G.R., CROWLEY W.F. Jr., (1986)
Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 62:1136
- MAIS V., CETEL N.S., MUSE K.N., QUIGLEY M.E., REID R.L., YEN S.S.C. (1987)
Hormonal dynamics during luteal-follicular transition.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 64:1109

- SAWYER-STEFFAN J.E., LASLEY B.L., HOFF J.D., YEN S.S.C. (1982)
Comparison of in-vitro bioactivity and immunoreactivity of serum LH in normal cyclic and hypogonadal women treated with low doses of LH-RH.
J. Reprod. Fertil., 65:45
- THOMAS C.M.G., SEGERS M.F.G. (1988)
Measurement of Serum hLH: hCG interference evaluated for two hLH-Specific IRMA kits.
Clin. Chem., 34:768
- LOUMAYE E., VANKRIEKEN L., DEPREESTER S., PSALTI I., de COOMAN S., THOMAS K. (1989)
Hormonal changes induced by short-term administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and their consequences for embryo development.
Fertil. and Steril., 51:105
- VERMES I., BONTE H.A., SLUIS VEER G., SCHOEMAKER J. (1991)
Interpretations of five monoclonal immunoassays of Lutropin and Follitropin: effects of normalization with WHO standard.
Clin. Chem., 37:415
- DEMOULIN A., DUBOIS M., GERDAY C., GILLAIN D., LAMBOTTE R., FRANCHIMONT P. (1991)
Variation of luteinizing hormone serum concentration after exogenous human chorionic gonadotropin administration during ovarian stimulation.
Fertil. and Steril., 55:796
- MASSA G., de ZECHER F., VANDERSCHUREN-LODEWYK K. (1992)
Serum levels of immunoreactive Inhibine, FSH and LH in human infants at Preterm and Term Birth.
Biol. of the Neonat., 61:150
- DE HERTOGH R., VANKRIEKEN L., THOMAS K. de GASPARO M. (1992)
Circhoral fluctuations of serum total renin, inhibin and related hormones around the mid-cycle in normal human females.
Hum. Reprod., 7:337

XIX. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS ml	CALIBRATORS ml	SAMPLE(S) CONTROLS ml
Calibrators (0-6) Samples, controls Tracer	- 0.05	0.1 0.05	- 0.1 0.05
Incubation	1 hour at room temperature with shaking at 700 rpm		
Separation Washing solution Separation Washing solution Separation	- - - - -	aspirate (or decant) 2.0 aspirate (or decant) 2.0 aspirate (or decant)	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>



fr

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

LHsp-IRMA

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunologique pour la mesure quantitative *in vitro* de l'Hormone de Lutéinisation (LH) dans le sérum humain.

II. INFORMATIONS GENERALES

A. Nom du produit : DIAsource LHsp-IRMA kit

B. Numéro de catalogue : KIP1311 : 96 Tests

C. Fabriqué par : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. Activité biologique

La LH ainsi que la FSH sont sécrétées par les cellules basophiles de l'hypophyse antérieure par suite de la sécrétion de la « gonadotrophine releasing hormone (GnRH) » par des cellules hypothalamiques. Chez des adultes, les hormones LH et FSH contrôlent des fonctions gonadiques; surtout la gamétogénèse et la sécrétion des stéroïdes.

B. Application clinique

La mesure des concentrations en LH et en FSH dans le sérum est essentielle pour l'investigation de la fertilité et, en particulier, des dysfonctionnements de l'axe hypothalamique/hypophysaire/gonadique. Le LHsp-IRMA est une trousse à phase unique qui est spécifique pour la LH. Cette trousse spécifique rend possible la mesure des concentrations en LH dans le sérum, indépendamment de la présence de hCG d'origine endogène (grossesse ou tumeur ectopique) ou exogène (programme de fertilisation *in vitro*, avec injection de pregnyl).

IV. PRINCIPES DU DOSAGE

La trousse DIAsource LHsp-IRMA est une trousse de dosage radio-immunologique basée sur la séparation en tube recouvert d'anticorps. Mabs1, les anticorps de capture, sont attachés sur la surface basse et interne du tube plastique. Les calibrateurs ou les échantillons ajoutés dans les tubes présenteront dans un premier temps une faible affinité pour Mabs1. L'addition de Mab2, l'anticorps signal marqué avec l^{125}I , complètera le système et déclenchera la réaction immunologique. Suite au lavage, la radioactivité restante liée au tube reflètera la concentration de l'antigène. L'utilisation de plusieurs Mabs différents évite l' hyperspécificité, commune aux IRMA deux-sites.

V. REACTIFS FOURNIS

Reactifs	96 tests Kit	Code Couleur	Reconstitution
Tubes recouverts avec l'anti LH (anticorps monoclonal)	2 x 48	Bleu	Prêt à l'emploi
TRACEUR: anti – LH marquée à $\text{l}^{125}\text{Iodine}$ (anticorps monoclonaux) dans un tampon TRIS-HCl avec de l'albumine bovine, de l'azide de sodium (<0,1%) et un colorant rouge inactif	1 flacon 5,5 ml 700 kBq	Rouge	Prêt à l'emploi
Calibrateur zéro dans du sérum bovin et du thymol	1 flacon lyophilisé	Jaune	Ajouter 2 ml d'eau distillée
Calibrateur N = 1 à 6 (cfr. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans du sérum bovin et du thymol	6 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 1 ml d'eau distillée
Solution de Lavage (Tris-HCl)	1 flacon 10 ml	Brun	Diluer 70 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
Contrôles - N = 1 ou 2 dans du plasma humain avec du thymol	2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée

Note:

1. Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons.
2. 1 mIU de la préparation du calibrateur est équivalent à 1 mIU de 2nd IRP 80/552.

VI. MATERIELS NON FOURNIS

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

1. Eau distillée
2. Pipettes pour distribuer: 50 µl, 100 µl, 500 µl, 1 ml et 2 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes en plastique est recommandée)
3. Agitateur vortex
4. Agitateur magnétique
5. Agitateur de tubes
6. Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
7. Système d'aspiration (optionnel)
8. Tout compteur gamma capable de mesurer l^{125}I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- Calibrateurs : Reconstituer le calibrateur zéro avec 2 ml d'eau distillée et les autres calibrateurs avec 1 ml d'eau distillée.
- Contrôles : Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
- Solution de Lavage : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x).

Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8 °C.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables pendant 3 jours entre 2 et 8 °C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquots devront être réalisés et ceux-ci seront gardés à -20°C, pendant 3 mois. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 24 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.

X. MODE OPERATOIRE

A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trusses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation. Mélangez tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon.

Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

B. Mode opératoire

1. Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse, en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts d'anticorps.
2. Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les contrôles et les échantillons. Puis distribuer 100 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
3. Distribuer 50 µl de traceur dans chaque tube.
4. Agiter légèrement le portoir de tube manuellement pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
5. Incuber pendant 1 heure à température ambiante sous agitation continue (700 rpm).
6. Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
7. Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
8. Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale).
9. Laver les tubes à nouveau avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer (ou décanter).
10. Après le dernier lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer (ou décanter) le reste de liquide.
11. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

1. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
2. Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les cpm (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en LH (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l'aide des points de calibration, écarter les valeurs aberrantes.
3. Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.

4. L'analyse informatique des données simplifiera les calculs. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.

XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont fournies pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe de calibration.

LHsp-IRMA	cpm	B/T (%)
Activité totale	246440	100
Calibrateur		
0,0 mIU/ml	207	0,1
1,8 mIU/ml	533	0,2
3,5 mIU/ml	1165	0,5
9,9 mIU/ml	3821	1,6
30,0 mIU/ml	12920	5,2
97,0 mIU/ml	50053	20,3
194,0 mIU/ml	93732	38,0

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES

A. Sensibilité

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 0,2 mIU/ml.

B. Spécificité

Des hormones cross-réactives ont été ajoutées à un calibrateur à valeur LH basse et à un calibrateur à valeur LH haute. La réponse LH apparente a été mesurée.

Hormone ajoutée	LHsp CAL 1 mIU/ml	LHsp CAL 5 mIU/ml
-	1,8	97
FSH 300 mIU/ml	1,6	87
hCG 300000 mIU/ml	2,4	85
TSH 300 µIU/ml	3,6	100

C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	$\text{} \pm \text{SD}$ (mIU/ml)	CV (%)	Sérum	N	$\text{} \pm \text{SD}$ (mIU/ml)	CV (%)
A	10	$6,6 \pm 0,3$	3,9	C	20	$5,9 \pm 0,5$	8,0
B	10	$49,6 \pm 0,7$	1,4	D	20	$56,7 \pm 1,9$	3,4

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE RECUPERATION

Echantillon	LH ajoutée (mIU/ml)	LH récupérée (mIU/ml)	Récupération (%)
1	0,5	0,7	130
	1,5	1,8	117
	5	4,5	89
	14	12,7	90
	46	46,1	100
2	0,5	0,7	140
	1,5	1,3	87
	5	4,7	94
	14	12,9	92
	46	43,8	95

TEST DE DILUTION

Echantillon	Dilution	Concent. théorique (mIU/ml)	Concent. Mesurée (mIU/ml)
1	1/1	-	79,7
	1/2	39,9	41,1
	1/4	19,9	19,9
	1/8	10,0	10,1
	1/16	5,0	5,3
	1/32	2,5	2,2
2	1/1	-	121,0
	1/2	60,5	53,0
	1/4	30,3	27,9
	1/8	15,1	14,9
	1/16	7,6	7,8
	1/32	3,8	3,8

Les échantillons ont été dilué avec le calibrateur zéro.

E. Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon

Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 30 minutes après que le calibrateur a été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

DELAIS		
	0'	30'
Echantillon 1 (mIU/ml)	2,2	2,3
Echantillon 2 (mIU/ml)	4,8	5,4
Echantillon 3 (mIU/ml)	53,6	54,6

F. Effet crochet

Un échantillon dopé avec du LH jusqu'à 1700 mIU/ml donne des cpm supérieurs au dernier point de calibration.

XIV. CÔNTROLE DE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs in duplo des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XV. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont données à titre d'information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.

L'intervalle est basé sur les percentiles de 2,5% & 97,5%.

Identification	Nombre de sujets	Moyen (mIU/ml)	Portée (mIU/ml)
Enfants (0 à 12 ans)			
▪ Garçons	20	0,2	0,0 – 1,4
▪ Filles	20	0,4	0,0 – 0,9
Adolescents (12 à 18 ans)	18	2,9	0,1 – 10,6
Adultes masculins	69	2,7	1,0 – 5,3
Femmes			
▪ Cycles ovariens			
- Phase folliculaire (jour -12 à -6)	34	4,3	0,8 – 10,4
- Jour sommet (jour 0)	49	19,6	2,9 – 41,1
- Phase lutéale (jour +6 à +12)	63	3,3	0,5 – 7,6
▪ Postménopausique	53	31,2	14,4 – 52,8

XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de l'¹²⁵I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35.5 keV).

Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux.

Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.

Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité.

Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

L'azide de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azide de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azide dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

1. CLARKE J.J., CUMMINS J.T. (1987)
Pulsatility of reproductive hormones: physiological basis and clinical implications.
Baillière's Clin. Endocrinol. Metab., 1:1
2. FILICORI M., SANTORO N., MERRIAN G.R., CROWLEY W.F. Jr., (1986)
Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 62:1136
3. MAIS V., CETEL N.S., MUSE K.N., QUIGLEY M.E., REID R.L., YEN S.S.C. (1987)
Hormonal dynamics during luteal-follicular transition.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 64:1109
4. SAWYER-STEFFAN J.E., LASLEY B.L., HOFF J.D., YEN S.S.C. (1982)
Comparison of in-vitro bioactivity and immunoreactivity of serum LH in normal cyclic and hypogonadal women treated with low doses of LH-RH.
J. Reprod. Fertil., 65:45
5. THOMAS C.M.G., SEGERS M.F.G. (1988)
Measurement of Serum hLH: hCG interference evaluated for two hLH-Specific IRMA kits.
Clin. Chem., 34:768
6. LOUMAYE E., VANKRIEKEN L., DEPREESTER S., PSALTI I., de COOMAN S., THOMAS K. (1989)
Hormonal changes induced by short-term administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and their consequences for embryo development.
Fertil. and Steril., 51:105
7. VERMES I., BONTE H.A., SLUIS VEER G., SCHOEMAKER J. (1991)
Interpretations of five monoclonal immunoassays of Lutropin and Follitropin: effects of normalization with WHO standard.
Clin. Chem., 37:415

8. DEMOULIN A., DUBOIS M., GERDAY C., GILLAIN D., LAMBOTTE R., FRANCHIMONT P. (1991)
Variation of luteinizing hormone serum concentration after exogenous human chorionic gonadotropin administration during ovarian stimulation.
Fertil. and Steril., 55:796
9. MASSA G., de ZECHER F., VANDERSCHUREN-LODEWYK K. (1992)
Serum levels of immunoreactive Inhibine, FSH and LH in human infants at Preterm and Term Birth.
Biol. of the Neonat., 61:150
10. DE HERTOGH R., VANKRIEKEN L., THOMAS K. de GASPARO M. (1992)
Circhoral fluctuations of serum total renin, inhibin and related hormones around the mid-cycle in normal human females.
Hum. Reprod., 7:337

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTALE (ml)	CALIBRA-TEURS (ml)	ECHANTIL-LON(S) CONTROLES (ml)
Calibrateurs (0-6) Echantillons, Contrôles Traceur	- 0,05	0,1 0,05	- 0,1 0,05
Incubation	1 heure à T.A. sous agitation continue		
Séparation Solution de Lavage Séparation Solution de Lavage Séparation	- - - - -	Aspiration 2,0 aspiration 2,0 aspiration	
Comptage	Temps de comptage des tubes: 60 secondes		



nl

Lees het hele protocol vóór gebruik.

LHsp-IRMA

I. BEOOGD GEBRUIK

Immunoradiometrische testkit voor de in vitro kwantitatieve bepaling van humaan Luteinizerend Hormoon (LH) in serum.

II. ALGEMENE INFORMATIE

A. Gedeponeerd handelsmerk: DIAsource LHsp-IRMA kit

B. Catalogusnummer: KIP1311 : 96 testen

C. Geproduceerd door: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie kunt u contact opnemen met:

Tel.: +32 (0)10 84 99 11 - Fax: +32 (0)10 84 99 91

III. KLINISCHE ACHTERGROND

A. Biologische activiteit

Zowel LH als FSH worden afgescheiden door de basofiele cellen van de hypofyse voorkwab ten gevolge de secretie van gonadotropine releasing hormone (GnRH) van hypothalamische cellen. Bij volwassenen controleren de LH en FSH hormonen geslachtsfuncties; vooral gametogenese en secretie van steroïden.

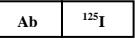
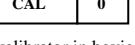
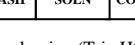
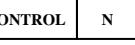
B. Klinische toepassingen

De bepaling van de concentraties van LH en FSH in serum is essentieel om de vruchtbaarheid te onderzoeken en in het bijzonder stoornissen van de hypothalamische/hypofysaire/gonadale as. De LHsp-IRMA is een één-stap test die specifiek is voor LH. Deze specifieke test maakt de meting mogelijk van de concentraties aan LH in serum, ongeacht de aanwezigheid van hCG van endogene (zwangerschap of ectopische tumor) of exogene oorsprong (*in vitro* bevruchtingsprogramma, met pregnylinjectie).

IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

LHsp-IRMA van DIAsource is een immunoradiometrische bepaling die gebaseerd is op een scheiding aan de hand van een gecoate buis. Mabs1, de invangantilichamen, zijn onderaan aan het binnenoppervlak van de plastic buis gehecht. Kalibrators of monsters die toegevoegd worden aan de buizen zullen aanvankelijk een lage affiniteit vertonen voor Mabs1. Toevoeging van Mab2, het signaalgenererend antilichaam dat gelabeld werd met ^{125}I , zal het systeem vervolledigen en de immunologische reactie teweegbrengen. Na de wasfase geeft de overblijvende radioactiviteit, gebonden aan de buis, de antigenconcentratie weer. Door het gebruik van meerdere verschillende Mabs wordt hyperspecificiteit vermeden, die gebruikelijk is voor IRMA met 2 Mabs.

V. GELEVERDE REAGENTIA

Reagentia	Kit met 96 testen	Kleur- code	Reconstitutie
 Buizen gecoat met anti-LH (monoklonale antilichamen)	2 x 48	blauw	Klaar voor gebruik
 Ab ^{125}I TRACER: Anti-LH (monoklonale antilichamen) gelabeld met ^{125}I in TRIS-HCl buffer met boven serumalbumine, azide (<0,1%) een inerte rode kleurstof	1 flacon 5,5 ml 700 kBq	rood	Klaar voor gebruik
 CAL 0 Nukalibrator in boven serum met thymol	1 flacon gevries-droogd	geel	2 ml gedestilleerd water toevoegen
 CAL N Kalibrator - N = 1 tot 6 (raadpleeg de flaconetiketten voor de exacte waarden) in boven serum met thymol	6 flacons, gevries-droogd	geel	1 ml gedestilleerd water toevoegen
 WASH SOLN CONC Wasoplossing (Tris-HCl)	1 flacon 10 ml	bruin	70 x met gedestilleerd water verdunnen (gebruik een magnetische roerder).
 CONTROL N Controles - N = 1 of 2 in humaan plasma met thymol.	2 flacons, gevries-droogd	zilver	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen

Opmerking:

1. Gebruik Nukalibrator voor monsterverdunningen
2. 1 mIE van de kalibratorbereiding is gelijk aan 1 mIE van 2nd IRP 80/552.

VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

De volgende materialen zijn noodzakelijk maar worden niet meegeleverd met de kit:

1. Gedestilleerd water.
2. Pipetten voor een volume van 50 μl , 100 μl , 500 μl , 1 ml en 2 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).
3. Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase.
4. Afzuigssysteem (facultatief).
5. Vortexmenger.
6. Magnetische roerder.
7. Schudder voor de buisjes.
8. Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van ^{125}I (rendement van ten minste 70%).

VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

- A. **Kalibrators:** Reconstitueer de nukalibrator met 2 ml gedestilleerd water en de andere kalibrators met 1 ml gedestilleerd water.
- B. **Controles:** Reconstitueer de controles met 0,5 ml gedestilleerd water.
- C. **Werk-wasoplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 69 eenheden gedestilleerd water toe te voegen aan 1 eenheid wasoplossing (70 x).

Gebruik een magnetische roerder voor de homogenisering. Op het eind van de dag moet de ongebruikte werk-wasoplossing afgevoerd worden.

VIII. OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA

- Vóór opening of reconstitutie zijn alle kitcomponenten houdbaar tot de vervaldatum, zoals vermeld op het etiket, indien zij bewaard werden bij 2 tot 8°C.
- Na reconstitutie zijn de kalibrators en de controles gedurende 3 dagen houdbaar bij 2 tot 8°C. Voor een langere bewaartijd moeten aliquots gemaakt worden, die bij -20°C bewaard moeten worden voor maximaal 3 maanden. Vermijd opeenvolgende cycli van bevriezen en ontdooiën.
- Een vers bereide werk-wasoplossing moet op dezelfde dag nog gebruikt worden.
- Na het eerste gebruik is de tracer houdbaar tot de vervaldatum, indien bewaard bij 2 tot 8°C in de oorspronkelijke, goed afgesloten flacon.
- Wijzigingen in het fysieke aspect van kitreagentia kunnen wijzen op instabiliteit of op een kwaliteitsvermindering.

IX. MONSTERAFNAME EN MONSTERBEREIDING

- Serum moet bij 2 tot 8°C bewaard worden.
- Indien de bepaling niet binnen 24 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze bij -20°C te bewaren.
- Vermijd opeenvolgende cycli van bevriezen en ontdooiën.

X. PROCEDURE

A. Opmerkingen bij de procedure

Gebruik de kit of de componenten niet langer dan de aangegeven vervaldatum. Materialen van kits van verschillende loten mogen niet gemengd worden. Laat alle reagentia op kamertemperatuur komen vóór gebruik.

Meng alle reagentia en monsters goed door ze voorzichtig te bewegen of door er voorzichtig mee te draaien. Om kruisbesmetting te vermijden, moet een propere wegwerpbare pipettip gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster.

Pipetten met een grote precisie of geautomatiseerde pipetteerapparatuur zullen de precisie verhogen. Respecteer de incubatietijden.

Bereid een kalibratiecurve voor elke run; men mag geen gegevens gebruiken van voorafgaande runs.

B. Procedure

1. Etiketteer de gecoate buisjes in duplo voor elke kalibrator, voor elk monster, voor elke controle. Etiketteer 2 normale buizen voor de bepaling van de totaal tellingen.
2. Vortex de kalibrators, controles en monsters gedurende korte tijd en pipetteer 100 μl van elk in de desbetreffende buis.
3. Pipetteer 50 μl van de tracer in elke buis.
4. Schud het rek met de buizen voorzichtig met de hand zodat eventueel ingesloten luchtbellen vrijkomen.
5. Incubeer gedurende 1 uur bij kamertemperatuur terwijl er voortdurend mee geschuud wordt (700 rpm).
6. Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer). Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van de gecoate buis komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
7. Was de buizen met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen). Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasoplossing.
8. Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer).
9. Was de buisjes nogmaals met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen) en zuig op (of decanteer).
10. Na de laatste wasfase moeten de buisjes gedurende twee minuten rechtop blijven staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
11. Tel de buizen in een gammateller gedurende 60 seconden.

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

1. Bereken het gemiddelde voor de bepalingen in duplo.
2. Zet de cpm (ordinaat) uit voor elke kalibrator tegen de overeenkomstige LH-concentratie (abscis) op semi-logarithmisch of lineair millimeterpapier en teken een kalibratiecurve door de kalibratiepunten, waarbij de duidelijke uitschieters verworpen worden.
3. Lees door interpolatie de concentratie voor elke controle en voor elk monster op de kalibratiecurve.
4. Door computergestuurde gegevensreductie worden deze berekeningen vereenvoudigd.

Indien de resultaten automatisch verwerkt worden, wordt de 4 parameter logistische functie aanbevolen voor de gepaste curve.

XII. KENMERKENDE GEGEVENS

De volgende gegevens dienen enkel ter illustratie en mogen in geen geval gebruikt worden ter vervanging van de real time kalibratiecurve.

LHsp-IRMA		cpm	B/T (%)
Totaaltelling		246440	100
Kalibrator	0,0 mIU/ml 1,8 mIU/ml 3,5 mIU/ml 9,9 mIU/ml 30,0 mIU/ml 97,0 mIU/ml 194,0 mIU/ml	207 533 1165 3821 12920 50053 93732	0,1 0,2 0,5 1,6 5,2 20,3 38,0

XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

A. Detectielimiet

Twintig nukalibrators werden bepaald, samen met een reeks andere kalibrators. De detectielimiet, omschreven als de schijnbare concentratie van twee standaarddeviaties boven de gemiddelde tellingen bij nulbinding, bedroeg 0,2 mIU/ml.

B. Specificiteit

Kruisreagerende hormonen werden toegevoegd aan kalibrators met lage en hoge waarden. De schijnbare respons van LH werd gemeten.

Toegevoegd hormoon	LHsp CAL 1 mIE/ml	LHsp CAL 5 mIE/ml
-	1,8	97
FSH 300 mIU/ml	1,6	87
hCG 300000 mIU/ml	2,4	85
TSH 300 µIU/ml	3,6	100

C. Precisie

BINNEN EEN TEST				TUSSEN TESTEN			
Serum	N	$\bar{X} \pm SD$ (mIE/ml)	VC (%)	Serum	N	$\bar{X} \pm SD$ (mIE/ml)	VC (%)
A	10	6,6 ± 0,3	3,9	C	20	5,9 ± 0,5	8,0
B	10	49,6 ± 0,7	1,4	D	20	56,7 ± 1,9	3,4

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

D. Nauwkeurigheid

RECOVERY -TEST			
Monster	Toegevoegd LH (mIE/ml)	Recovery van LH (mIU/ml)	Recovery (%)
1	0,5	0,7	130
	1,5	1,8	117
	5	4,5	89
	14	12,7	90
	46	46,1	100
2	0,5	0,7	140
	1,5	1,3	87
	5	4,7	94
	14	12,9	92
	46	43,8	95

VERDUNNINGSTEST

Monster	Verdunning	Theoretische concentratie (mIE/ml)	Concentratie die bepaald werd (mIE/ml)
1	1/1	-	79,7
	1/2	39,9	41,1
	1/4	19,9	19,9
	1/8	10,0	10,1
	1/16	5,0	5,3
	1/32	2,5	2,2
2	1/1	-	121,0
	1/2	60,5	53,0
	1/4	30,3	27,9
	1/8	15,1	14,9
	1/16	7,6	7,8
	1/32	3,8	3,8

De monsters zijn verdunnen met Nukalibrator.

- F. **Tijdspanne tussen de laatste kalibrator en distributie van het monster**
Zoals hieronder weergegeven wordt, blijven de resultaten van de bepaling nauwkeurig, zelfs wanneer een monster 30 minuten na toevoeging van de kalibrator in de gecoate tubes gepipetteerd wordt.

TIJDSPANNE		
	0'	30'
Monster 1 (mIE/ml)	2,2	2,3
Monster 2 (mIE/ml)	4,8	5,4
Monster 3 (mIE/ml)	53,6	54,6

G. "Hook"-effect

Een monster, dat met LH gespiket werd tot 1700 mIE/ml, levert hogere tellingen op dan het laatste kalibratiepunt.

XIV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

- Indien de resultaten, die verkregen werden voor controle 1 en/of controle 2, niet binnen het bereik vallen zoals vermeld op het flaconetiket, dan mogen de resultaten niet gebruikt worden tenzij een bevredigende uitleg gegeven wordt voor de discrepantie.
- Indien gewenst, kan elk laboratorium zijn eigen pools voor controlemasters maken, die dan in aliquots bewaard moeten worden in de diepvriezer.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van monsters moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.

XV. REFERENTIE-INTERVALS

Deze waarden worden slechts als leidraad gegeven; elk laboratorium moet zijn eigen normaal bereik van waarden uitmaken.

Bereik gebaseerd op 2,5% & 97,5% percentielen.

Identificatie	Aantal subjecten	Gemiddelde (mIE/ml)	Bereik (mIE/ml)
Kinderen (0 tot 12 jaar)			
▪ jongens	20	0,2	0,0 – 1,4
▪ meisjes	20	0,4	0,0 – 0,9
Pubers (12 tot 18 jaar)	18	2,9	0,1 – 10,6
Mannelijke volwassenen	69	2,7	1,0 – 5,3
Vrouwen			
▪ Ovulatiecycli			
- Folliculaire fase (dag -12 tot -6)	34	4,3	0,8 – 10,4
- Ovulatiepiek (dag 0)	49	19,6	2,9 – 41,1
- Luteale fase (dag +6 tot +12)	63	3,3	0,5 – 7,6
▪ Postmenopausaal	53	31,2	14,4 – 52,8

XVI. VOORZORGSMATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.

Deze kit bevat ^{125}I (halfwaardetijd: 60 dagen), dat ioniserende X- (28 keV) en γ -stralen (35.5 keV) uitzendt.

Dit radioactieve product mag enkel overhandigd worden aan en gebruikt worden door bevoegd personeel; ontvangst, opslag, gebruik en overdracht van radioactieve producten zijn onderworpen aan de wetgeving van het land van de eindgebruiker. In geen geval mag het product toegediend worden aan mensen of dieren.

Alle handelingen met radioactief materiaal moeten plaatsvinden in een daartoe bestemde ruimte, waar uitsluitend bevoegd personeel toegelaten wordt. Een logboek met ontvangst en opslag van radioactieve materialen moet worden bijgehouden in het laboratorium. Laboratoriumapparatuur en glaswerk, dat eventueel gecontamineerd werd met radioactieve bestanddelen, moeten worden gesegregeerd om kruisbesmetting van verschillende radioisotopen te vermijden.

Als radioactief materiaal gemorst werd, dan moet dat onmiddellijk gereinigd worden in overeenstemming met de procedure voor stralingsveiligheid. Het radioactieve afval moet worden weggegooid in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften en richtlijnen van de autoriteiten waaronder het laboratorium valt. Naleving van de basisregels van stralingsveiligheid zorgt voor een juiste bescherming.

De componenten, afkomstig van menselijk bloed, in deze kit werden getest door in Europa goedgekeurde en/of door de Amerikaanse FDA goedgekeurde methoden op aanwezigheid van HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en 2 en gaven een negatief resultaat. Geen enkele bekende methode kan echter volledige garantie bieden dat derivaten van menselijk bloed geen hepatitis, aids of andere infecties overdragen. Daarom moet men reagentia, serum- of plasmamonsters behandelen in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures.

Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel infectieus materiaal.

Vermijd dat de reagentia (natriumazide als conserveremiddel) in contact komen met de huid. Azide in deze kit kan reageren met lood en koper in de afvoerleidingen en op die manier zeer explosive metaalaziden vormen. Tijdens de wasfase moeten de afvoerleidingen ruimschoots met water nagespoeld worden om ophoping van azide te vermijden.

Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkruimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen.

1. CLARKE J.J., CUMMINS J.T. (1987)
Pulsatility of reproductive hormones: physiological basis and clinical implications.
Baillière's Clin. Endocrinol. Metab., 1:1
2. FILICORI M., SANTORO N., MERRIAN G.R., CROWLEY W.F. Jr., (1986)
Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 62:1136
3. MAIS V., CETEL N.S., MUSE K.N., QUIGLEY M.E., REID R.L., YEN S.S.C. (1987)
Hormonal dynamics during luteal-follicular transition.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 64:1109
4. SAWYER-STEFFAN J.E., LASLEY B.L., HOFF J.D., YEN S.S.C. (1982)
Comparison of in-vitro bioactivity and immunoreactivity of serum LH in normal cyclic and hypogonadal women treated with low doses of LH-RH.
J. Reprod. Fertil., 65:45
5. THOMAS C.M.G., SEGERS M.F.G. (1988)
Measurement of Serum hLH: hCG interference evaluated for two hLH-Specific IRMA kits.
Clin. Chem., 34:768

6. LOUMAYE E., VANKRIEKEN L., DEPREESTER S., PSALTI I., de COOMAN S., THOMAS K. (1989)
Hormonal changes induced by short-term administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and their consequences for embryo development.
Fertil. and Steril., 51:105
7. VERMES I., BONTE H.A., SLUIS VEER G., SCHOEMAKER J. (1991)
Interpretations of five monoclonal immunoassays of Lutropin and Follitropin: effects of normalization with WHO standard.
Clin. Chem., 37:415
8. DEMOULIN A., DUBOIS M., GERDAY C., GILLAIN D., LAMBOTTE R., FRANCHIMONT P. (1991)
Variation of luteinizing hormone serum concentration after exogenous human chorionic gonadotropin administration during ovarian stimulation.
Fertil. and Steril., 55:796
9. MASSA G., de ZECHER F., VANDERSCHUREN-LODEWYK K. (1992)
Serum levels of immunoreactive Inhibine, FSH and LH in human infants at Preterm and Term Birth.
Biol. of the Neonat., 61:150
10. DE HERTOGH R., VANKRIEKEN L., THOMAS K. de GASPARO M. (1992)
Circhoral fluctuations of serum total renin, inhibin and related hormones around the mid-cycle in normal human females.
Hum. Reprod., 7:337

XVIII. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	TOTAAL-TELLINGEN (ml)	KALIBRATOR(S) (ml)	MONSTER(S) CONTROLES (ml)
Kalibrators (0 -6) Monsters, Controles Tracer	- - 0,05	0,1 - 0,05	- 0,1 0,05
Incubatie	1 uur bij kamertemperatuur terwijl er voortdurend mee geschuud wordt.		
Scheidung Werk-wasoplossing Scheidung Werk-wasoplossing Scheidung	- - - - -	opzuigen (of decanteren) 2,0 opzuigen (of decanteren) 2,0 opzuigen (of decanteren)	
Telling		Tel de buisjes gedurende 60 seconden	

CE

de

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

LHsp-IRMA

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem luteinisierendes Hormon (LH) in Serum.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

A. Handelsbezeichnung : DIAsource LHsp-IRMA Kit

B. Katalognummer : KIP1311 : 96 Tests

C. Hergestellt von: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Biologische Aktivität

LH und FSH werden nach Ausschüttung von Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) durch den Hypothalamus in den basophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet.

Beim Erwachsenen steuern die Hormone LH und FSH die Gonadenfunktionen, vor allem die Gametogenese und die Steroidsekretion.

B. Klinische Anwendung

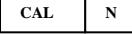
Die Messung der LH und FSH-Konzentrationen im Serum ist bei der Untersuchung der Fertilität und vor allem von Störungen der Hypothalamus/Hypophyse/Gonaden-Achse unerlässlich.

Der LHsp-IRMA ist für LH spezifischer Einschrittassay. Dieser spezifische Assay ermöglicht die Messung von LH-Konzentrationen im Serum, ungeachtet der Anwesenheit von hCG endogenen (Schwangerschaft oder ektopischer Tumor) oder exogenen Ursprungs (*in vitro* Fertilisierungsprogramm mit Pregnyl-Injektion).

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DiaSource LHsp-IRMA ist ein Radioimmuno-Assay in beschichteten Röhrchen. Mabs1, die Fänger-Antikörper, haften an der unteren inneren Oberfläche des Plastikröhrechens. In die Röhrchen zugegebene Kalibratoren oder Proben zeigen zuerst eine niedrige Affinität zu Mabs1. Zugabe von Mab2, des mit ^{125}I markierten Signalantikörpers, vervollständigt das System und triggert die immunologische Reaktion. Nach dem Waschen gibt die verbleibende, an den Röhrchen haftende Radioaktivität die Antigenkonzentration wieder. Die Verwendung einiger unterschiedlicher Mabs vermeidet die sonst bei zweiseitigem IRMA auftretende Hyperspezifität.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Test Kit	Farb Code	Rekonstitution
 Mit anti LH-beschichtete Röhrchen (monoklonale Antikörper)	2 x 48	blau	gebrauchsfertig
 TRACER: ^{125}I markierter Anti-LH (monoklonale Antikörper) in TRIS-HCl puffer mit Rinderserum-albumin, Azid (<0,1%) und inertem roten Farbstoff	1 Gefäß 5,5 ml 700 kBq	rot	gebrauchsfertig
 Null Kalibrator in Rinderserum mit Thymol	1 Gefäß lyophil.	gelb	2 ml dest. Wasser zugeben
 Kalibrator - N = 1 to 6 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Rinderserum mit Thymol	6 Gefäße lyophil.	gelb	1 ml dest. Wasser zugeben
 Waschlösung (Tris-HCl)	1 Gefäß 10 ml	braun	70 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
 Kontrollen - N = 1 or 2 Humanplasma mit Thymol	2 Gefäße lyophil.	silber	0,5 ml dest. Wasser zugeben

Bemerkung:

1. Benutzen Sie Null Kalibrator zur Probenverdünnung.
2. 1 mIU der Standardzubereitung ist äquivalent zu 1 mIU 2nd IRP 80/552.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, wird aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

1. Dest. Wasser
2. Pipetten: 50 µl, 100 µl, 500 µl, 1 ml und 2 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Wegwerf-Plastikspitzen wird empfohlen)
3. 5 ml automatische Spritze (Cornwall Typ) zum Waschen
4. Absaugsystem (optional)
5. Vortex Mixer
6. Magnetrührer
7. Schüttler für Röhrchen
8. Jegl. Gamma-Counter, der ^{125}I messen kann, kann verwendet werden. (minimal Yield 70%)

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. **Kalibratoren**: Rekonstituieren Sie den Null Kalibrator mit 2 ml dest. Wasser, die anderen Kalibratoren mit 1 ml dest. Wasser.
- B. **Kontrollen**: Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. Wasser.
- C. **Waschlösung**: Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (70x) mit 69 Anteilen dest. Wasser zu.

Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Verwerfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2°C bis 8°C stabil.
- Nach der Rekonstitution sind die Kalibratoren und Kontrollen bei 2°C bis 8°C 3 Tage stabil. Aliquots müssen bei längerer Aufbewahrung bei -20°C eingefroren werden, dann sind sie 3 Monate haltbar. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist der Tracer bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2° bis 8°C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serumproben müssen bei 2 – 8°C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, ist die Aufbewahrung bei -20°C erforderlich.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

X. DURCHFÜHRUNG

A. Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum. Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur. Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Wegwerf-Pipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden. Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten. Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Standardkurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

B. Durchführung

1. Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
2. Vortexen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben kurz und geben Sie jeweils 100 µl in ihre Röhrchen.
3. Geben Sie 50 µl des Tracers in jedes Röhrchen.
4. Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
5. Inkubieren Sie 1 Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (700 rpm)
6. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren Sie) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
7. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
8. Saugen Sie den Inhalt jeden Röhrchens (außer Gesamtaktivität) ab.
9. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie).
10. Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
11. Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter 60 Sekunden aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
2. Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration LH (Abszisse) und zeichnen Sie eine Standardkurve durch die Standardpunkte, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
3. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Standardkurve.
4. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer "4 Parameter"-Kurvenfunktion.

XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitstandardkurve verwendet werden.

LHsp-IRMA		cpm	B/T (%)
Gesamtaktivität		246440	100
Kalibrator	0,0 mIU/ml	207	0,1
	1,8 mIU/ml	533	0,2
	3,5 mIU/ml	1165	0,5
	9,9 mIU/ml	3821	1,6
	30,0 mIU/ml	12920	5,2
	97,0 mIU/ml	50053	20,3
	194,0 mIU/ml	93732	38,0

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen.

Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 0,2 mIU/ml.

B. Spezifität

Kreuzreaktive Hormone wurden zu einem minderwertigen und zu einem hochwertigen Kalibrator zugegeben. Das Scheinbare LH Ergebnis wurde gemessen.

zugegeben Hormone	LHsp CAL 1 mIU/ml	LHsp CAL 5 mIU/ml
-	1,8	97
FSH 300 mIU/ml	1,6	87
hCG 300000 mIU/ml	2,4	85
TSH 300 µIU/ml	3,6	100

C. Präzision

INTRA ASSAY INTER ASSAY

Serum	N	$\text{\timesX} \pm \text{SD}$ (mIU/ml)	CV (%)	Serum	N	$\text{\timesX} \pm \text{SD}$ (mIU/ml)	CV (%)
A	10	$6,6 \pm 0,3$	3,9	C	20	$5,9 \pm 0,5$	8,0
B	10	$49,6 \pm 0,7$	1,4	D	20	$56,7 \pm 1,9$	3,4

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST

Probe	Zugeg. LH (mIU/ml)	Wiedergef. LH (mIU/ml)	Wiedergefundene (%)
1	0,5	0,7	130
	1,5	1,8	117
	5	4,5	89
	14	12,7	90
	46	46,1	100
2	0,5	0,7	140
	1,5	1,3	87
	5	4,7	94
	14	12,9	92
	46	43,8	95

VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünn.	Theoret. Konzent. (mIU/ml)	Gemess. Konzent. (mIU/ml)
1	1/1	-	79,7
	1/2	39,9	41,1
	1/4	19,9	19,9
	1/8	10,0	10,1
	1/16	5,0	5,3
	1/32	2,5	2,2
	1/1	-	121,0
2	1/2	60,5	53,0
	1/4	30,3	27,9
	1/8	15,1	14,9
	1/16	7,6	7,8
	1/32	3,8	3,8
	1/1	-	121,0
	1/2	60,5	53,0

Die Proben wurden mit Null Kalibrator verdünnt.

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann erhalten bleibt, wenn die Probe 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugefügt wird.

ZEITABSTAND

	0'	30'
Probe 1 (mIU/ml)	2,2	2,3
Probe 2 (mIU/ml)	4,8	5,4
Probe 3 (mIU/ml)	53,6	54,6

F. Hookeffekt

Eine Probe mit LH bis zu 1700 mIU/ml liefert höhere Messwerte als der letzte Kalibratormeßwert.

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls Extra-Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

XV. REFERENZ INTERVALLE

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

Bereich auf basis der 2,5% und 97,5% Perzentile

Identifikation	Anzahl von Personen	Mittelwert (mIU/ml)	Bereich (mIU/ml)
Kinder (0 bis 12 Jahre)			
▪ Jungen	20	0,2	0,0 – 1,4
▪ Mädchen	20	0,4	0,0 – 0,9
Jugendliche (12 bis 18 Jahre)			
	18	2,9	0,1 – 10,6
Erwachsene Männer			
	69	2,7	1,0 – 5,3
Frauen			
▪ Ovulationszyklen			
- Follikelsphase (Tag -12 bis -6)	34	4,3	0,8 – 10,4
- Ovulationsgipfel (Tag 0)	49	19,6	2,9 – 41,1
- Lutealphase (Tag +6 bis +12)	63	3,3	0,5 – 7,6
▪ Postmenopausal	53	31,2	14,4 – 52,8

XV. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ^{125}I (Halbwertzeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35.5 keV) Strahlungen emittiert.

Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausrüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern. Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde.

Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiös betrachtet werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflussrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschriften den Abfluss gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

Bitte rauchen, trinken, essen oder wenden Sie Kosmetika nicht in Ihrem Arbeitsbereich an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

XVII. LITERATUR

- CLARKE J.J., CUMMINS J.T. (1987)
Pulsatility of reproductive hormones: physiological basis and clinical implications.
Baillière's Clin. Endocrinol. Metab., 1:1
- FILICORI M., SANTORO N., MERRIAN G.R., CROWLEY W.F. Jr., (1986)
Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 62:1136
- MAIS V., CETEL N.S., MUSE K.N., QUIGLEY M.E., REID R.L., YEN S.S.C. (1987)
Hormonal dynamics during luteal-follicular transition.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 64:1109
- SAWYER-STEFFAN J.E., LASLEY B.L., HOFF J.D., YEN S.S.C. (1982)
Comparison of in-vitro bioactivity and immunoreactivity of serum LH in normal cyclic and hypogonadal women treated with low doses of LH-RH.
J. Reprod. Fertil., 65:45
- THOMAS C.M.G., SEGERS M.F.G. (1988)
Measurement of Serum hLH: hCG interference evaluated for two hLH-Specific IRMA kits.
Clin. Chem., 34:768
- LOUMAYE E., VANKRIEKEN L., DEPREESTER S., PSALTI I., de COOMAN S., THOMAS K. (1989)
Hormonal changes induced by short-term administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and their consequences for embryo development.
Fertil. and Steril., 51:105

- VERMES I., BONTE H.A., SLUIS VEER G., SCHOEMAKER J. (1991)
Interpretations of five monoclonal immunoassays of Lutropin and Follitropin: effects of normalization with WHO standard.
Clin. Chem., 37:415
- DEMOULIN A., DUBOIS M., GERDAY C., GILLAIN D., LAMBOTTE R., FRANCHIMONT P. (1991)
Variation of luteinizing hormone serum concentration after exogenous human chorionic gonadotropin administration during ovarian stimulation.
Fertil. and Steril., 55:796
- MASSA G., de ZECHER F., VANDERSCHUREN-LODEWKY K. (1992)
Serum levels of immunoreactive Inhibin, FSH and LH in human infants at Preterm and Term Birth.
Biol. of the Neonat., 61:150
- DE HERTOGH R., VANKRIEKEN L., THOMAS K. de GASPARO M. (1992)
Circhoral fluctuations of serum total renin, inhibin and related hormones around the mid-cycle in normal human females.
Hum. Reprod., 7:337

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT-AKTIVITÄT (ml)	KALIBRA-TOREN (ml)	PROBE(N) KONTROLLEN (ml)
Kalibratoren (0-6) Proben, Kontrollen Tracer	- - 0,05	0,1 - 0,05	- 0,1 0,05
Inkubation	1 Std. bei RT unter ständigem Schütteln		
Trennung Waschlösung Trennung Waschlösung Trennung	- - - - -	absaugen (oder dekant.) 2,0 absaugen (oder dekant.) 2,0 absaugen (oder dekant.)	
Gamma Counter	60 Sekunden messen		



es

Leer el protocolo completo antes de usar.

LHsp-IRMA

I. INSTRUCCIONES DE USO

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa *in vitro* de la Hormona Luteinizante (LH) humana en suero.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIAsource LHsp-IRMA Kit
- B. **Número de Catálogo:** KIP1311 : 96 Tests
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A. Actividad biológica

La LH y la FSH son segregadas por las células basófilas de la glándula pituitaria anterior a causa de la secreción de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por células hipotalámicas. En adultos, las hormonas LH y FSH controlan funciones gonadales; especialmente la gametogenesis y la secreción de esteroides.

B. Aplicación clínica

La medición de las concentraciones de la LH y de la FSH en suero es esencial para la investigación de la fertilidad y particularmente de disfunciones del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. La LHsp-IRMA es un ensayo monofásico que es específico para la LH. Este ensayo específico hace posible la medición de las concentraciones de la LH en suero, a pesar de la presencia de hCG de origen endógeno (embarazo o tumor ectópico) o exógeno (programa de fertilización *in vitro*, con inyección de pregnyl).

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

LHsp-IRMA de DIAsource es un radioinmunoensayo basado en la separación en tubo recubierto de anticuerpos. Mabs1, los anticuerpos de captura, se adhieren en la parte inferior inferior de las paredes del tubo de poliestireno. Al principio calibradores o muestras añadidos en los tubos presentarán poca afinidad con Mabs1. La adición de Mab2, el anticuerpo señal marcado con ^{125}I , completará el sistema y activará la reacción inmunológica. Después del lavado, la radiactividad restante adherida al tubo, refleja la concentración del antígeno. El uso de varios Mabs distintos evita hiperespecificidad, propio de IRMA dos-puntos.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	96 tests Kit	Código de Color	Reconstitución
Tubos recubiertos con anti LH (anticuerpos monoclonales)	2 x 48	azul	Listo para uso
Ab ^{125}I	1 vial 5,5 ml 700 kBq	rojo	Listo para uso
TRAZADOR: anti-LH (anticuerpos monoclonales) marcado con ^{125}I en tampón TRIS-HCl con albumina bovina, azida (<0,1%) y un colorante rojo inerte			
CAL 0 Calibrador cero en suero bovino y thymol	1 vial liofilizado	amarillo	Añadir 2 ml de agua destilada
CAL N Calibradores N = 1 a 6 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en suero bovino y thymol	6 viales liofilizados	amarillo	Añadir 1 ml de agua destilada
WASH SOLN CONC Solución de lavado (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
CONTROL N Controles - N = 1 o 2 en plasma humano y thymol.	2 viales liofilizados	plateado	Añadir 0,5 ml de agua destilada

Nota:

1. Para diluciones de muestras utilizar Calibrador cero.
2. 1 mUI de la preparación del calibrador es equivalente a 1 mUI 2nd IRP 80/552.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

El material mencionado a continuación es necesario y no esta incluido en el kit

1. Agua destilada
2. Pipetas de 50 μl , 100 μl , 500 μl , 1ml y 2 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Vortex
4. Agitador magnético
5. Agitador de tubos
6. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
7. Sistema de aspiración (opcional)
8. Contador de radiaciones gamma para medir I^{125} (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

- Calibradores:** Reconstituir el calibrador cero con 2 ml de agua destilada y los otros calibradores con 1 ml de agua destilada.
- Controles:** Reconstituir los controles con 0,5 ml de agua destilada.
- Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). Utilizar un agitador magnético para

homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Despues de su reconstitución los calibradores y controles son estables durante 3 días a 2 – 8°C. Para periodos más largos, alícuotar y guardar a – 20°C como mucho 3 meses. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Despues del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a 2-8°C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero deben ser guardadas a 2 – 8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 24hrs., almacenar las muestras a –20°C.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.

X. PROTOCOLO

A. Notas de manejo

No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente número de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso. Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra. El uso de pipetas de precisión ó equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación. Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

B. Protocolo

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada uno de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
2. Agitar brevemente los calibradores, controles y muestras y dispensar 100 μl de cada uno en sus respectivos tubos.
3. Dispensar 50 μl del trazador en cada tubo, incluyendo los tubos no recubiertos destinados a las Cuentas Totales.
4. Agitar suavemente la gradilla de tubos para eliminar cualquier burbuja pegada de las paredes de los tubos.
5. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante (700 rpm).
6. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
7. Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado.
8. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales)
9. Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar).
10. Despues del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el liquido restante.
11. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CALCULO DE RESULTADOS

1. Calcular la media de los duplicados.
2. Representar en un gráfico semilogarítmico o **linear las c.p.m.** (ordenada) de cada calibrador frente a las concentraciones de LH (abscisa) y dibujar una curva de calibración por los puntos de calibración, rechazando los duplicados discordantes.
3. Leer la concentración para cada control y muestra por interpolación en la curva de calibración.
4. Métodos computarizados de proceso de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de calculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica “4 parámetros”.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados como una calibración real.

LHsp-IRMA		cpm	B/T (%)
Cuentas Totales		246440	100
Calibrador	0,0 mUI/ml	207	0,1
	1,8 mUI/ml	533	0,2
	3,5 mUI/ml	1165	0,5
	9,9 mUI/ml	3821	1,6
	30,0 mUI/ml	12920	5,2
	97,0 mUI/ml	50053	20,3
	194,0 mUI/ml	93732	38,0

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Límite de detección

Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores.

El límite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares sobre la media de enlace del calibrador cero, fue de 0,2 mUI/ml.

B. Especificidad

Hormonas con reacción cruzada se añadieron a un calibrador con valor LH bajo y a un calibrador con valor LH elevado. La respuesta aparente fue medida.

Hormona añadida	LHsp CAL 1 mUI/ml	LHsp CAL 5 mUI/ml
-	1,8	97
FSH 300 mUI/ml	1,6	87
hCG 300000 mUI/ml	2,4	85
TSH 300 µUI/ml	3,6	100

C. Precisión

PRECISIÓN INTRA-ENSAYO

PRECISIÓN INTER-ENSAYO

Suero	N	$\text{\langle X \rangle \pm SD$ (mUI/ml)	CV (%)	Suero	N	$\text{\langle X \rangle \pm SD$ (mUI/ml)	CV (%)
A	10	$6,6 \pm 0,3$	3,9	C	20	$5,9 \pm 0,5$	8,0
B	10	$49,6 \pm 0,7$	1,4	D	20	$56,7 \pm 1,9$	3,4

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DILUCIÓN

Muestra	Dilución	Concent. Teórica (mUI/ml)	Concent. Medida (mUI/ml)
1	1/1	-	79,7
	1/2	39,9	41,1
	1/4	19,9	19,9
	1/8	10,0	10,1
	1/16	5,0	5,3
	1/32	2,5	2,2
2	1/1	-	121,0
	1/2	60,5	53,0
	1/4	30,3	27,9
	1/8	15,1	14,9
	1/16	7,6	7,8
	1/32	3,8	3,8

Las muestras fueron diluidas con calibrador cero.

TEST DE RECUPERACIÓN

Muestra	LH añadido (mUI/ml)	LH Recuperado (mUI/ml)	Recuperado (%)
1	0,5	0,7	130
	1,5	1,8	117
	5	4,5	89
	14	12,7	90
	46	46,1	100
2	0,5	0,7	140
	1,5	1,3	87
	5	4,7	94
	14	12,9	92
	46	43,8	95

E. Tiempo de espera entre la dispensación del último calibrador y la de la muestra

Como se muestra a continuación la precisión del ensayo se mantiene incluso en el caso de dispensar la muestra 30 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos cubiertos.

TIEMPO DE ESPERA		
	0'	30'
Muestra 1 (mUI/ml)	2,2	2,3
Muestra 2 (mUI/ml)	4,8	5,4
Muestra 3 (mUI/ml)	53,6	54,6

F. Efecto "gancho"

Una muestra con LH de 1700 mUI/ml presenta cuentas más elevadas que el último punto de calibración.

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, lo cuales se guardan en alícuotas congeladas.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados de los duplicados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores solamente sirven de guía; cada laboratorio tiene que establecer sus propios valores normales.

Alcance basados en percentiles de 2,5% & 97,5%

Identificación	Número de sujetos	Media (mUI/ml)	Rango (mUI/ml)
Niños (0 a 12 años)			
▪ Muchachos	20	0,2	0,0 – 1,4
▪ Muchachas	20	0,4	0,0 – 0,9
Púberes (12 a 18 años)	18	2,9	0,1 – 10,6
Adultos masculinos	69	2,7	1,0 – 5,3
Mujeres			
▪ Ciclo ovulatorio			
- Fase folicular (día -12 a -6)	34	4,3	0,8 – 10,4
- Pico ovulatorio (día 0)	49	19,6	2,9 – 41,1
- fase luteínica (día +6 a +12)	63	3,3	0,5 – 7,6
▪ Postmenopáusicas	53	31,2	14,4 – 52,8

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I^{125} (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes.

Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.

Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.

Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes contenido substancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.

Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.

No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. CLARKE J.J., CUMMINS J.T. (1987)
Pulsatility of reproductive hormones: physiological basis and clinical implications.
Baillière's Clin. Endocrinol. Metab., 1:1
2. FILICORI M., SANTORO N., MERRIAN G.R., CROWLEY W.F. Jr., (1986)
Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 62:1136
3. MAIS V., CETEL N.S., MUSE K.N., QUIGLEY M.E., REID R.L., YEN S.S.C. (1987)
Hormonal dynamics during luteal-follicular transition.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 64:1109
4. SAWYER-STEFFAN J.E., LASLEY B.L., HOFF J.D., YEN S.S.C. (1982)
Comparison of in-vitro bioactivity and immunoreactivity of serum LH in normal cyclic and hypogonadal women treated with low doses of LH-RH.
J. Reprod. Fertil., 65:45
5. THOMAS C.M.G., SEGERS M.F.G. (1988)
Measurement of Serum hLH: hCG interference evaluated for two hLH-Specific IRMA kits.
Clin. Chem., 34:768
6. LOUMAYE E., VANKRIEKEN L., DEPREESTER S., PSALTI I., de COOMAN S., THOMAS K. (1989)
Hormonal changes induced by short-term administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and their consequences for embryo development.
Fertil. and Steril., 51:105
7. VERMES I., BONTE H.A., SLUIS VEER G., SCHOOEMAKER J. (1991)
Interpretations of five monoclonal immunoassays of Lutropin and Follitropin: effects of normalization with WHO standard.
Clin. Chem., 37:415

8. DEMOULIN A., DUBOIS M., GERDAY C., GILLAIN D., LAMBOTTE R., FRANCHIMONT P. (1991)
Variation of luteinizing hormone serum concentration after exogenous human chorionic gonadotropin administration during ovarian stimulation.
Fertil. and Steril., 55:796
9. MASSA G., de ZECHER F., VANDERSCHUREN-LODEWYK K. (1992)
Serum levels of immunoreactive Inhibin, FSH and LH in human infants at Preterm and Term Birth.
Biol. of the Neonat., 61:150
10. DE HERTOGH R., VANKRIEKEN L., THOMAS K. de GASPARO M. (1992)
Circhoral fluctuations of serum total renin, inhibin and related hormones around the mid-cycle in normal human females.
Hum. Reprod., 7:337

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (μ l)	CALIBRADO RES (μ l)	MUESTRA(S) CONTROL(S) (μ l)
Calibradores (0 al 6)	-	100	-
Muestras, controles	-	-	100
Trazador	50	50	50
Incubación	1 hora a T.A. en agitación constante		
Separación	-	aspirar	
Solución de Lavado	-	2,0 ml	
Separación	-	aspirar	
Solución de Lavado	-	2,0 ml	
Separación	-	aspirar	
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

CE

el

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

LHsp-IRMA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Κιτ ανοσοραδιομετρικού προσδιορισμού για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) στον ορό και το πλάσμα.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

A. Εμπορική ονομασία: Κιτ LHsp-IRMA της DIAsource

B. Αριθμός καταλόγου: KIP1311: 96 προσδιορισμοί

C. Κατασκευάζεται από την: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Φαξ: +32 (0)10 84.99.91

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Βιολογική δράση

Τόσο η LH όσο και η FSH απεκκρίνονται από τα βασεόφιλα κύτταρα του προσθίου τμήματος της υπόφυσης ως αποτέλεσμα της απέκκρισης της εκλυτικής ορμόνης της γοναδοτροπίνης (GnRH) από κύτταρα του υποθαλάμου.

Στους ενηλίκους, οι ορμόνες LH και FSH ελέγχουν τις γοναδικές λειτουργίες, κυρίως τη γαμετογένεση και την απέκκριση στεροειδών.

B. Κλινική εφαρμογή

Η μέτρηση των συγκεντρώσεων της LH και FSH στον ορό είναι σημαντική για τη διερεύνηση της γονιμότητας και ειδικά διαταραχών του άξονα υποθάλαμος/υπόφυση/γονάδες.

Ο προσδιορισμός LHsp-IRMA είναι προσδιορισμός ενός βήματος, ειδικός για την LH. Αυτός ο ειδικός προσδιορισμός επιτρέπει τη μέτρηση των συγκεντρώσεων της LH στον ορό, άσχετα από την παρουσία hCG ενδογενούς (κύηση ή εκτοπικός όγκος) ή εξωγενούς προέλευσης (*in vitro* γονιμοποίησης, με έγχυση pregnyl).

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η εξέταση LHsp-IRMA της DiaSource είναι ένας ανοσοραδιομετρικός προσδιορισμός που βασίζεται σε διαχωρισμό επιστρωμένων σωληναρίων. Τα Mabs1, τα αντισώματα σύλληψης, προσκολλώνται στην κάτω και εσωτερική επιφάνεια του πλαστικού σωληναρίου. Οι βαθμονομητές ή τα δείγματα που προστίθενται στα σωληνάρια εμφανίζουν κατ' αρχήν χαμηλή συγγένεια προς τα Mabs1. Προσθήκη Mab2, του αντισώματος σηματοδότησης που είναι σημασμένο με ^{125}I , θα ολοκληρώσει το σύστημα και θα πυροδοτήσει την ανοσολογική αντίδραση. Μετά την πλήρη, η υπολειπόμενη ραδιενέργεια, που είναι δεσμευμένη στο σωληνάριο, αντανακλά τη συγκέντρωση του αντιγόνου. Η χρήση αρκετών διακριτών Mabs εμποδίζει την υπερειδικότητα.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Ποσότητα 96 προσδιορισμού	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση
Σωληνάρια επιστρωμένα με αντι-LH (μονοκλωνικά αντισώματα)	2 x 48	μπλε	Έτοιμο για χρήση
Ab 125I Αντi-LH (μονοκλωνικά αντισώματα) σημασμένα με ^{125}I σε ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-HCl με βάσει ορολευκωματίνη, αζίδιο του νατρίου (<0,1%) και αδρανής κόκκινη χρωστική	1 φιαλίδιο 5,5 ml 700 kBq	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
CAL 0 Μηδενικός βαθμονομητής σε βόειο ορό με θυμόλη	1 φιαλίδιο λυοφιλ.	κίτρινο	Προσθέστε 2 ml απεσταγμένου νερού
CAL N Βαθμονομητές 1-6 σε βόειο ορό με θυμόλη (δείτε ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων)	6 φιαλίδια λυοφιλ.	κίτρινο	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού
WASH SOLN CONC Διάλυμα πλύσης (TRIS-HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
CONTROL N Οροί ελέγχου 1 και 2 σε ανθρώπινο πλάσμα με θυμόλη	2 φιαλίδια λυοφιλ.	ασημί	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού

Σημείωση: 1. Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις ορών.
2. 1 mIU του παρασκευάσματος του βαθμονομητή είναι ισοδύναμο με 1 mIU του 2nd IRP 80/552.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

- Απεσταγμένο νερό
- Πιπέτες για διανομή: 50 μl, 100 μl, 500 μl, 1 ml και 2 ml. (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη).
- Αναμείκης στροβιλισμού
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Συσκευή ανάδευσης σωληναρίων
- Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
- Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό).
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε μετρητής για ακτινοβολίας με δυνατότητα μέτρησης ^{125}I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε το μηδενικό βαθμονομητή με 2 ml απεσταγμένου νερού και άλλους βαθμονομητές με 1 ml απεσταγμένου νερού.
- Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (70x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2-8°C.
- Μετά την ανασύσταση, οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου παραμένουν σταθεροί επί 3 ημέρες στους 2-8°C. Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, θα πρέπει να δημιουργηθούν κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης και να διατηρηθούν σε θερμοκρασία -20°C επί 3 μήνες το μέγιστο. Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμηνευτικό κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2-8°C.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Ο ορός πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8°C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη στους -20°C.
- Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**
Μή χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες πια. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλόγιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακριβεία βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακριβείας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.
- Διαδικασία**
 - Σημάνετε επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα. Για τον προσδιορισμό των μετρήσεων του ιχνηθέτη ^{125}I ("total"), σημάνετε 2 κοινά (μη επιστρωμένα) σωληνάρια.
 - Αναμείξτε για λίγο (με αναμείκηση στροβιλισμού τύπου vortex) βαθμονομητές, δείγματα και ορούς ελέγχου και διανείμετε 100 μl από έκαστο στα αντίστοιχα σωληνάρια.
 - Διανείμετε 50 μl ιχνηθέτη αντi-LH- ^{125}I σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβάνοντας τη μη επιστρωμένα σωληνάρια για τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total").
 - Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
 - Επωάστε επί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα σωληναρίων στις 700 rpm.
 - Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total")). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
 - Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total"))). Αποφύγετε

το σχηματισμό αφορού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.

8. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ^{125}I ["total"]).
9. Πλύνετε τα σωληνάρια και πάλι με 2 ml διαλύματος πλύσης (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ^{125}I ["total"]) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε).
10. Μετά την τελευταία πλύση, αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα νερού που απομένει.
11. Μετρήστε τα σωληνάρια σε μετρητή γ ακτινοβολίας για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1. Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
2. Σε ημιλογαριθμικό ή γραμμικό χαρτί γραφημάτων, παραστήστε γραφικά τις c.p.m. (κρούσεις ανά λεπτό) (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της LH (τετμημένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
3. Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε ορό ελέγχου και δείγμα με αναγωγή στην καμπύλη βαθμονομητής.
4. Αναγωγή δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

LHsp-IRMA	cpm	B/T (%)
Κρούσεις του ^{125}I ("total")	246440	100
Βαθμονομητής		
0,0 mIU/ml	207	0,1
1,8 mIU/ml	533	0,2
3,5 mIU/ml	1165	0,5
9,9 mIU/ml	3821	1,6
30,0 mIU/ml	12920	5,2
97,0 mIU/ml	50053	20,3
194,0 mIU/ml	93732	38,0

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

Μετρήθηκαν είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 0,2 μIU/ml.

B. Ειδικότητα

Ορμόνες διασταυρούμενης αντιδραστικότητας προστέθηκαν σε ένα βαθμονομητή χαμηλής και υψηλής τιμής LH. Μετρήθηκε η φαινομενική απόκριση της LH.

Προστεθείσα ορμόνη	LHsp CAL 1 mIU/ml	LHsp CAL 5 mIU/ml
-	1,8	97
FSH 300 mIU/ml	1,6	87
hCG 300000 mIU/ml	2,4	85
TSH 300 μIU/ml	3,6	100

Γ. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ

Ορός	N	$\langle X \rangle \pm T.A.$ mIU/ml	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	$\langle X \rangle \pm T.A.$ mIU/ml	Σ.Δ. (%)
A	10	6,6 ± 0,3	3,9	C	20	5,9 ± 0,5	8,0
B	10	49,6 ± 0,7	1,4	D	20	56,7 ± 1,9	3,4

Δ. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Δείγμα	Προστεθείσα LH (mIU/ml)	Ανακτηθείσα LH (mIU/ml)	Ανάκτηση (%)
1	0,5	0,7	130
	1,5	1,8	117
	5	4,5	89
	14	12,7	90
	46	46,1	100
2	0,5	0,7	140
	1,5	1,3	87
	5	4,7	94
	14	12,9	92
	46	43,8	95

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (mIU/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (mIU/ml)
1	1/1	-	79,7
	1/2	39,9	41,1
	1/4	19,9	19,9
	1/8	10,0	10,1
	1/16	5,0	5,3
	1/32	2,5	2,2
2	1/1	-	121,0
	1/2	60,5	53,0
	1/4	30,3	27,9
	1/8	15,1	14,9
	1/16	7,6	7,8
	1/32	3,8	3,8

Τα δείγματα αραιώθηκαν με μηδενικό βαθμονομητή.

E. Μεσοδιάστημα

Οπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν αξιόπιστα ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 30 λεπτά μετά την προσθήκη του βαθμονομητή στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ

	0'	30'
Δείγμα 1 (mIU/ml)	2,2	2,3
Δείγμα 2 (mIU/ml)	4,8	5,4
Δείγμα 3 (mIU/ml)	53,6	54,6

ΣΤ. Φαινόμενο αγκιστρού (hook)

Δείγμα που εμβολιάστηκε με LH έως 1700 μIU/ml δίνει σήμα πάνω από την υψηλότερη συγκέντρωση του βαθμονομητή.

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλίδιου, τα αποτελέσματα δεν είναι δύνατο να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές παρέχονται πιο κάτω μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.

Το πεδίο τιμών εκφράζεται ως ποσοστά επί τοις εκατό 2,5% έως 97,5%.

Ταυτοποίηση	Αριθμός ασύρματον	Μέση τιμή (mIU/ml)	Πεδίο τιμών (mIU/ml)
Παιδιά (0 έως 12 ετών)			
▪ Αγόρια	20	0,2	0,0 – 1,4
▪ Κορίτσια	20	0,4	0,0 – 0,9
Έφηβοι (12 έως 18 ετών)	18	2,9	0,1 – 10,6
Αρρενες ενήλικοι	69	2,7	1,0 – 5,3
Γυναίκες			
▪ Κύκλοι ωορρηξίας			
- Ωοθυλακική φάση (ημέρα -12 έως -6)	34	4,3	0,8 – 10,4
- Κορυφή ωορρηξίας (ημέρα 0)	49	19,6	2,9 – 41,1
- Ωχρινική φάση (ημέρα +6 έως +12)	63	3,3	0,5 – 7,6
▪ Μετεμψηνοπαυσιακές	53	31,2	14,4 – 52,8

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφαλείας

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.

Το κιτ αυτό περιέχει το ^{125}I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιοντίζουσα ακτινοβολία X (28 keV) και γ (35.5 keV).

Αντό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.

Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσοτόπων.

Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο κιτ αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγων του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαρφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αξιόδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αξιόδιο στο κιτ αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αξιόδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσώρευσης αξιόδιου.

Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης.

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- CLARKE J.J., CUMMINS J.T. (1987) **Pulsatility of reproductive hormones: physiological basis and clinical implications.** Baillière's Clin. Endocrinol. Metab., 1:1

FILICORI M., SANTORO N., MERRIAN G.R., CROWLEY W.F. Jr., (1986)

Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 62:1136

- MAIS V., CETEL N.S., MUSE K.N., QUIGLEY M.E., REID R.L., YEN S.S.C. (1987)
Hormonal dynamics during luteal-follicular transition.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 64:1109
- SAWYER-STEFFAN J.E., LASLEY B.L., HOFF J.D., YEN S.S.C. (1982)
Comparison of in-vitro bioactivity and immunoreactivity of serum LH in normal cyclic and hypogonadal women treated with low doses of LH-RH.
J. Reprod. Fertil., 65:45
- THOMAS C.M.G., SEGERS M.F.G. (1988)
Measurement of Serum hLH: hCG interference evaluated for two hLH-Specific IRMA kits.
Clin. Chem., 34:768
- LOUMAYE E., VANKRIEKEN L., DEPREESTER S., PSALTI I., de COOMAN S., THOMAS K. (1989)
Hormonal changes induced by short-term administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and their consequences for embryo development.
Fertil. and Steril., 51:105
- VERMES I., BONTE H.A., SLUIS VEER G., SCHOEMAKER J. (1991)
Interpretations of five monoclonal immunoassays of Lutropin and Follitropin: effects of normalization with WHO standard.
Clin. Chem., 37:415
- DEMOULIN A., DUBOIS M., GERDAY C., GILLAIN D., LAMBOTTE R., FRANCHIMONT P. (1991)
Variation of luteinizing hormone serum concentration after exogenous human chorionic gonadotropin administration during ovarian stimulation.
Fertil. and Steril., 55:796
- MASSA G., de ZECHER F., VANDERSCHUREN-LODEWKY K. (1992)
Serum levels of immunoreactive Inhibine, FSH and LH in human infants at Preterm and Term Birth.
Biol. of the Neonat., 61:150
- DE HERTOGH R., VANKRIEKEN L., THOMAS K. de GASPARO M. (1992)
Circhoral fluctuations of serum total renin, inhibin and related hormones around the mid-cycle in normal human females.
Hum. Reprod., 7:337

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΚΡΟΥΣΕΙΣ "TOTAL" ml	ΒΑΘΜΟΝΟΜΗ- ΤΕΣ ml	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ml
Βαθμονομητές (0-6) Δείγματα, οροί ελέγχου Ιχνηθέτης	- 0,05	0,1 0,05	- 0,1 0,05
Επώαση	1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση στις 700 rpm		
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης Διαχωρισμός	- - - -	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2,0 Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2,0 Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)	
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα		

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

LHsp-IRMA

I. PRZEZNACZENIE

Oznaczenie immunoradiometryczne do ilościowego pomiaru ludzkiego hormonu luteinizującego (Luteinizing Hormone (LH)) w surowicy metodą *in vitro*.

II. INFORMACJE OGÓLNE

A. Nazwa firmowa: DIAsource LHsp-IRMA Kit

B. Numer katalogowy: KIP1311: 96 oznaczeń

C. Wyprodukowano przez: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgia.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:
Tel: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACJE KLINICZNE

A. Aktywność biologiczna

Zarówno LH, jak i FSH są wydzielane przez komórki zasadowe przysadki, w wyniku sekrecji hormonu gonadoliberyny (GnRH) w podwzgórzu.

U dorosłych, hormony LH i FSH kontrolują funkcje gonad, a zwłaszcza gametogenezę i wydzielanie sterydów.

B. Zastosowania kliniczne

Pomiar stężeń LH i FSH w surowicy jest podstawowym badaniem w diagnostyce niepłodności a zwłaszcza zaburzeń osi podwzgórzowo/przysadkowo/gonadalnej.

Oznaczenie LHsp-IRMA jest testem jednoetapowym, swoistym dla LH. To swoiste oznaczenie pozwala na pomiar LH w surowicy, niezależnie od endogennego występowania hCG (np. w ciąży lub w guzach ektopowych), lub egzogennego podawania hCG (np. iniekcje hormonalne w programach zapłodnienia *in vitro*).

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

Oznaczenie DIAsource LHsp-IRMA jest metodą immunoradiometryczną, opartą na separacji w opłaszczeniach probówkach. Mabs 1 – przeciwciała przechwytyjące – są umocowane do dolnej i wewnętrznej powierzchni plastikowej probówki. Kalibratory lub próbki, dodawane do probówek, będą na początku wykazywały niskie powinowactwo do Mabs1. Dodanie Mab2, przeciwcała sygnałowego oznakowanego ^{125}I zakończy etap i wyzwoli reakcję immunologiczną. Po przepukaniu, stopień radioaktywności związanej z probówką odzwierciedla stężenie antygenu. Wykorzystywanie różnych Mabs pozwala na uniknięcie nadmiernej czułości.

V. DOSTARCZONE ODCZYNNIKI

Odczynnik	Ilość 96 oznaczeń	Kolor	Rekonstytucja
Probówki opłaszczone przeciwcałami anti LH (przeciwciała monoklonalne)	2 x 48	niebieski	Gotowe do zastosowania
Ab ^{125}I	1 fiołka 5,5 ml 700 kBq	czerwony	Gotowe do zastosowania
Przeciwciała (monoklonalne) anti-LH znakowane Jodem 125 w buforze TRIS zawierającym bydlęcą albuminę surowiczą, azydek (<0,1 %) i czerwony barwnik.			
CAL 0	1 fiołka liofil.	żółty	Dodać 2 ml wody destylowanej
Kalibratory 0 w surowicy bydlęcej z tymolem			
CAL N	6 fiolek liofil.	żółty	Dodać 1 ml wody destylowanej
Kalibratory 1 - 6 w surowicy bydlęcej z tymolem (dokładne wartości na etykietach fiolek)			
WASH SOLN CONC	1 fiołka 10 ml	brązowy	Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).
Roztwór pluczający (TRIS-HCl)			
CONTROL N	2 fiołek liofil.	srebrny	Dodać 0,5 ml wody destylowanej
Kontrole 1 i 2 w osocza ludzkiego z tymolem			

Uwaga: 1. Do rozcieńczania próbek należy użyć kalibratora zerowego.
 2. 1 mIU preparatu kalibratora jest równoważne do 1 mIU z 2th IRP 80/552.

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

Poniższe materiały są wymagane, ale nie są dostarczone w zestawie:

- Woda destylowana
- Pipety do dostarczania objętości: 50 µl, 100 µl, 500 µl 1 ml i 2 ml. (zaleca się stosowanie właściwych pipet z jednorazowymi końcówkami plastycznymi)
- Mieszadło wirowe
- Mieszadło magnetyczne
- Wytrząsarka próbówek
- Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania
- Układ do aspiracji (opcjonalnie)
- Może być wykorzystywany jakikolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru ^{125}I (minimalny uzysk 70%).

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- Kalibratory:** Rekonstytuować kalibrator 0 przy pomocy 2 ml wody destylowanej a inne kalibratory przy pomocy 1 ml wody destylowanej.
- Kontrole:** Kontrole należy rekonstytuować przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.
- Roboczy roztwór pluczający:** Właściwą objętość roboczego roztworu pluczającego należy przygotować dodając 69 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu pluczającego (70x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszadło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór pluczający należy wyłączyć pod koniec dnia.

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstytucją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykiecie, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Po rozpuszczeniu, kalibratory i kontrole zachowują stabilność przez 3 dni w temperaturze 2-8°C.
W razie konieczności dłuższego przechowywania, niewielkie objętości powinny być przechowywane w temperaturze -20°C przez maksymalnie 3 miesiące. Unikać cykli rozmrzania i zamrażania.
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór pluczający powinien być wykorzystany w tym samym dniu.
- Po jego pierwszym zastosowaniu, znaczek izotopowy zachowuje trwałość do podanej daty ważności jeżeli jest przechowywany w oryginalnej, dobrze zamkniętej fiołce w temperaturze od 2 do 8°C.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Próbki surowicy muszą być przechowywane w temperaturze 2-8°C.
- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 24 godzin, zaleca się przechowywanie w temperaturze -20°C.
- Unikać powtarzanych cykli zamrażania i rozmrzania.

X. PROCEDURA

A. Uwagi dotyczące obsługi

Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upłynięciu daty ważności.
Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów. Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową.
Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie.
Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste, jednorazowe końcówki pipet.
Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia. Przestrzegać czasów inkubacji.
Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.

B. Procedura

- Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli należy oznaczyć opłaszczone probówki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 zwykłe probówki.
- Szybko wymieszać wirując: kalibratory, próbki i kontrole, i dozować po 100 µl każdej substancji do odpowiednich probówek.
- Dodać 50 µl anti-LH- ^{125}I (znaczek izotopowy) do wszystkich probówek w tym do nieopłaszczonych probówek do całkowitego zliczania.
- Delikatnie potrząsać (ręcznie) stożek z probówkami, aby uwolnić wszelkie, uwieńzione pęcherzyki powietrza.
- Inkubować przez 60 minut w temperaturze pokojowej na miesiadle wirowym (700 obrotów/min).
- Aspirować (lub odrąć) zawartość każdej probówki (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania). Aby usunąć cały płyn należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej probówki.
- Przepłukać probówki przy pomocy 2 ml roboczego roztworu pluczającego (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania). W trakcie dodawania roboczego roztworu pluczającego należy unikać wytwarzania piany.
- Aspirować (lub odrąć) zawartość każdej probówki (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania).
- Ponownie przepłukać probówki przy pomocy 2 ml roztworu pluczającego

- (z wyjątkiem próbówek do całkowitego zliczania) i aspirować (lub odlać).
10. Po ostatnim plukaniu, pozostawić próbówki w pozycji stojącej do góry na dwie minuty i aspirować pozostałe krople płynu
 11. Zliczać próbówki w liczniku gamma przez 60 sekund.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

1. Obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
2. Na papierze milimetrowym lub w kratkę wykreślić c.p.m. (rzędna) dla każdego kalibratora wobec odpowiadającego stężenia LH (odcięta) oraz wykreślić krzywą kalibracji przez punkty kalibratora, odrzucając oczywiste wartości odbiegające od linii środkowej.
3. Odczytać stężenie dla każdej kontroli i próbki przez naniesienie na krzywą kalibracyjną.
4. Redukcja danych przy pomocy komputera pozwoli uprościć te obliczenia. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

Poniższe dane są przedstawione wyłącznie w celach przykładowych i nie powinny być nigdy stosowane zamiast rzeczywistych krzywych kalibracyjnych.

LHsp-IRMA	cpm	B/T (%)
Zliczanie całkowite	246440	100
Kalibrator		
0,0 mIU/ml	207	0,1
1,8 mIU/ml	533	0,2
3,5 mIU/ml	1165	0,5
9,9 mIU/ml	3821	1,6
30,0 mIU/ml	12920	5,2
97,0 mIU/ml	50053	20,3
194,0 mIU/ml	93732	38,0

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Granica wykrywania

Dwadzieścia kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów. Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmienne stężenie dwóch odchyleń standardowych powyżej przeciętnej wartości zliczania przy wiązaniu zerowym kształtała się na poziomie 0,2 mIU/ml.

B. Swoistość

Hormony reagujące krzyżowo były dodane do kalibratora niskich i wysokich poziomów LH. Oznaczano przybliżoną odpowiedź LH.

Dodany hormon	LHsp CAL 1 mIU/ml	LHsp CAL 5 mIU/ml
-	1,8	97
FSH 300 mIU/ml	1,6	87
hCG 300000 mIU/ml	2,4	85
TSH 300 µIU/ml	3,6	100

C. Precyzja

W SERII				POMIĘDZY SERIAMI			
Surowica	N	X ± S.D. (mIU/ml)	CV %	Surowica	N	X ± S.D. (mIU/ml)	CV %
A	10	6,6 ± 0,3	3,9	C	20	5,9 ± 0,5	8,0
B	10	49,6 ± 0,7	1,4	D	20	56,7 ± 1,9	3,4

SD Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

D. Dokładność

BADANIE ODZYSKU

Próbka	LH dodana (mIU/ml)	LH odzyskany (mIU/ml)	Odzysk (%)
1	0,5	0,7	130
	1,5	1,8	117
	5	4,5	89
	14	12,7	90
	46	46,1	100
2	0,5	0,7	140
	1,5	1,3	87
	5	4,7	94
	14	12,9	92
	46	43,8	95

BADANIE ROZCIEŃCZENIA

Próbka	Rozcieńczenie	Stęž. teoretyczne (mIU/ml)	Stęž. zmierzone (mIU/ml)
1	1/1	-	79,7
	1/2	39,9	41,1
	1/4	19,9	19,9
	1/8	10,0	10,1
	1/16	5,0	5,3
	1/32	2,5	2,2
2	1/1	-	121,0
	1/2	60,5	53,0
	1/4	30,3	27,9
	1/8	15,1	14,9
	1/16	7,6	7,8
	1/32	3,8	3,8

Próbki zostały rozcieńczone przy pomocy kalibrator zerowy

E. Opóźnienie pomiędzy oznaczeniem ostatniego kalibratora i dozowaniem próbki

Jak wykazano, wyniki pomiaru pozostają dokładne nawet wówczas, gdy od momentu dodania kalibratora do opłaszczonych próbówek minęło 30 minut.

OPÓŹNIENIE

	0'	30'
Próbka 1 (mIU/ml)	2,2	2,3
Próbka 2 (mIU/ml)	4,8	5,4
Próbka 3 (mIU/ml)	53,6	54,6

F. Efekt hook'a

Próbka nasyciona LH o stężeniu do 1700 mIU/ml daje wyższe wartości zliczeń niż kalibrator o najwyższym stężeniu.

XIV. OGRANICZENIA

- Próbki od pacjentów, którzy w celach diagnostycznych lub terapeutycznych otrzymywali preparaty z mysich przeciwciał monoklonalnych, mogą zawierać ludzkie przeciwciała anty-mysie (HAMA). Próbki takie, oznaczane z użyciem zestawów testowych wykorzystujących mysie przeciwciało monoklonalne, mogą wykazywać wartości fałszywie zwyżone lub zanizowane.
- Przeciwciało heterofilne w ludzkiej surowicy mogą reagować z immunoglobulinami odczynnika, interferując z oznaczeniami immunologicznymi przeprowadzanymi in vitro. Pacjenci rutynowo eksponowani na zwierzęta lub produkty z surowic zwierzęcych mogą wykazywać skłonność do takich interferencji i w razie obecności przeciwciał heterofilnych występować mogą u nich nieprawidłowe wyniki testów. Wyniki oznaczeń próbek od pacjentów z takimi przeciwciałami należy interpretować z ostrożnością. Jeżeli wyniki nie są zgodne z obserwacjami klinicznymi, przed postawieniem rozpoznania powinny być uzyskane dodatkowe informacje.

XV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli wyniki uzyskane dla kontroli 1 i/lub 2 nie znajdują się w zakresie określonym na etykietce fiołki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane dopóki nie uda się znaleźć właściwego wyjaśnienia tego odchylenia.

- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiórce w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach. Nie wolno zamrażać i rozmrażać więcej niż dwukrotnie.
- Dopuszczalne kryteria dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium.

XVI. ZAKRESY REFERENCYJNE

Wartości przedstawione poniżej mają wyłącznie cel orientacyjny; każde laboratorium powinno opracować własne zakresy norm.
Zakres jest wyrażony jako 2,5 – 97,5% percentyla.

Identyfikacja	Liczba osobników	Średnia (mIU/ml)	Zakres (mIU/ml)
Dzieci (0 – 12 lat)			
▪ Chłopcy	20	0,2	0,0 – 1,4
▪ Dziewczęta	20	0,4	0,0 – 0,9
Okres dojrzewania (12 – 18 lat)			
	18	2,9	0,1 – 10,6
Dorośli mężczyźni			
	69	2,7	1,0 – 5,3
Kobiety			
▪ Cykle jajnikowe			
- Faza folikularna (od -12 do -6 dnia)	34	4,3	0,8 – 10,4
- Szczyt owulacyjny (dzień 0)	49	19,6	2,9 – 41,1
- Faza lutearna (od +6 do +12 dnia)	63	3,3	0,5 – 7,6
▪ Okres pomenopauzalny	53	31,2	14,4 – 52,8

XVII. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Bezpieczeństwo

Tylko do diagnostyki *in vitro*.

Zestaw zawiera ^{125}I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35,5 keV).

Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.

Obsługa materiałów radioaktywnych powinno być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wyposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone substancjami radioaktywnymi powinno być oddzielone w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów.

Wszelkie plamy z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczane zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie.

Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwiał anty-HCV, anty-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności, że materiały pochodzenia ludzkiego nie przenoszą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego postępowanie z odczynnikami i próbками surowicy lub osocza powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydlęce pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.

Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierającymi azydek sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią i ołowiem w układzie kanalizacyjnym tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków.

Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów, bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

XIII. BIBLIOGRAFIA

1. CLARKE J.J., CUMMINS J.T. (1987)
Pulsatility of reproductive hormones: physiological basis and clinical implications.
Baillière's Clin. Endocrinol. Metab., 1:1
2. FILICORI M., SANTORO N., MERRIAN G.R., CROWLEY W.F. Jr., (1986)
Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 62:1136
3. MAIS V., CETEL N.S., MUSE K.N., QUIGLEY M.E., REID R.L., YEN S.S.C. (1987)
Hormonal dynamics during luteal-follicular transition.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 64:1109
4. SAWYER-STEFFAN J.E., LASLEY B.L., HOFF J.D., YEN S.S.C. (1982)
Comparison of in-vitro bioactivity and immunoreactivity of serum LH in normal cyclic and hypogonadal women treated with low doses of LH-RH.
J. Reprod. Fertil., 65:45
5. THOMAS C.M.G., SEGERS M.F.G. (1988)
Measurement of Serum hLH: hCG interference evaluated for two hLH-Specific IRMA kits.
Clin. Chem., 34:768
6. LOUMAYE E., VANKRIEKEN L., DEPREESTER S., PSALTI I., de COOMAN S., THOMAS K. (1989)
Hormonal changes induced by short-term administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and their consequences for embryo development.
Fertil. and Steril., 51:105
7. VERMES I., BONTE H.A., SLUIS VEER G., SCHOEMAKER J. (1991)
Interpretations of five monoclonal immunoassays of Lutropin and Follitropin: effects of normalization with WHO standard.
Clin. Chem., 37:415
8. DEMOULIN A., DUBOIS M., GERDAY C., GILLAIN D., LAMBOTTE R., FRANCHIMONT P. (1991)
Variation of luteinizing hormone serum concentration after exogenous human chorionic gonadotropin administration during ovarian stimulation.
Fertil. and Steril., 55:796
9. MASSA G., de ZECHER F., VANDERSCHUREN-LODEWYK K. (1992)
Serum levels of immunoreactive Inhibine, FSH and LH in human infants at Preterm and Term Birth.
Biol. of the Neonat., 61:150
10. DE HERTOGH R., VANKRIEKEN L., THOMAS K. de GASPARO M. (1992)
Circhoral fluctuations of serum total renin, inhibin and related hormones around the mid-cycle in normal human females.
Hum. Reprod., 7:337

XIX. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

	CALKOWITA LICZBA ZLICZEŃ ml	KALIBRATORY ml	PRÓBKA(I) KONTROLE ml
Kalibratory (0-6)	-	0,1	-
Próbki, kontrole	-	-	0,1
Znacznik izotopowy	0,05	0,05	0,05
Inkubacja	60 minut w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem 700 rpm		
Rozdzielenie	-	aspiracja (lub odlewanie)	
Roztwór pluczący	-	2,0	
Rozdzielenie	-	aspiracja (lub odlewanie)	
Roztwór pluczający	-	2,0	
Rozdzielenie	-	aspiracja (lub odlewanie)	
Zliczanie	Zliczanie próbówek przez 60 sekund		



bu

Прочетете целия протокол преди употреба

LHsp-IRMA

I. УПОТРЕБА

Имуорадиометричен кит за количествени измервания *in vitro* на човешки лутеинизиращ хормон (LH) в серум.

II. ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

A. Патентовано име: DIAsource LHsp-IRMA Kit

B. Каталожен номер: KIP1311: 96 теста

C. Произведено от: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve,
Belgium.

За техническа помощ или поръчка:
Тел.: +32 (0)10 84.99.11 Факс: +32 (0)10 84.99.91

III. КЛИНИЧЕН ПРЕГЛЕД

A. Биологична активност

Двата LH (лутеинизиращ хормон) и FSH (фоликулостимулиращ хормон) се секретират от базофилните клетки в предния дял на хипофизата като резултат от секрецията на гонадотропин-освобождаващ хормон (GnRH) от клетките на хипоталамуса.

При възрастни хормоните LH и FSH контролират гонадните функции: основно гаметогенезата и секрецията на стероиди.

B. Клинично приложение

Измерванията на серумните концентрации на LH и FSH са от основно значение за изследване на фертилитета и особено за диагностициране нарушения по хипоталамо-хипофизо-яйчниковата ос.

LHsp-IRMA е изследване от една стъпка, специфично за LH. Това специфично изследване подпомага измерването на серумните концентрации на LH, независимо от наличието на hCG (човешки хорионгонадотропин) от ендогенен (при бременност или ектопичен тумор) или екзогенен (при провеждане на *in vitro* фертилизация с инжекционно прилагане на Pregnyl) произход.

IV. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА

DIAsource LHsp-IRMA е имунорадиометрично изследване на база на сепарация на покрити епруветки. Mabs1 (моноклонални антитела), които са прихващащи антитела, са разположени по долната и вътрешната повърхност на пластмасовата епруветка. Калибраторите или пробите, които се добавят към епруветките отначало показват слаб афинитет към Mabs1. Добавянето на Mabs2, които са сигнални антитела, маркирани с ^{125}I , завършват системата и пускат в ход имунологичната реакция. След измиване остатъчната радиоактивност, свързана с епруветката, отразява антигенната концентрация. Използването на няколко различни Mabs предотвратява развитието на хиперспецифичност.

V. ИЗПОЛЗВАНИ РЕАГЕНТИ

Реагенти	Количество 96 теста	Цветен код	Приготвяне
 Епруветки, покрити с анти-LH (моноклонални антитела)	2 x 48	син	Готов за употреба
Ab ^{125}I Анти-LH- ^{125}I (моноклонални антитела) в TRIS-HCl буфер със волски серумен албумин, натриев азид (<0.1%) и инертна червена боя	1 флакон 5.5 ml 700 kBq	червен	Готов за употреба
CAL 0 Нулев Калибратор във волски serum с тимол	1 флакон лиофилизиран	жълт	Добавете 2 ml дестилирана вода
CAL N Калибратори 1-6 във волски serum с тимол (викторини съдържащи точни стойности на етикетите на фланконите)	6 флаакона лиофилизириани	жълт	Добавете 1 ml дестилирана вода
WASH SOLN CONC Измиващ разтвор (TRIS-HCl)	1 флакон 10 ml	кафяв	Разредете 70x с дестилирана вода (използвайте магнитен сепаратор)
CONTROL N Контроли 1 и 2 в човешка плазма с тимол	2 флаакона лиофилизириани	сребърен	Добавете 0.5 ml дестилирана вода

Забележка: 1. Използвайте нулевия калибратор за серумните разреждания.
2. 1 mIU от калибирирания препарат е еквивалентен на 1 mIU от 2nd IRP 80/552.

VI. СРЕДСТВА, КОИТО НЕ СЕ ОСИГУРЯВАТ

Следните материали са необходими, но не се осигуряват в набора:

1. Дестилирана вода
2. Пипети от: 50 μl , 100 μl , 500 μl , 1 ml и 2 ml (препоръчва се използването на прецизни пипети с накрайници за еднократна употреба).
3. Завихрящ смесител
4. Магнитен сепаратор
5. Клатещо устройство за епруветки
6. 5 ml автоматична спринцовка (тип Cornwall) за измиване
7. Аспирационна система (по избор).
8. Всякакъв гама брояч, който може да измери употребеното количество ^{125}I (минимален капацитет от 70%).

VII. ПРИГОТВЯНИЕ НА РЕАГЕНТА

- A. Калибратори:** Реконституирайте нулевия калибратор с 2 ml дестилирана вода, а другия калибратор – с 1 ml дестилирана вода.
- B. Контроли:** Реконституирайте контролите с 0.5 ml дестилирана вода.
- C. Работен измиващ разтвор:** Подгответе адекватен обем от работния измиващ разтвор чрез добавянето на 69 обема дестилирана вода към 1 обем от измивачия разтвор (70x). Използвайте магнитен сепаратор, за да хомогенизирате. Изхвърлете неупотребеното количество от работния измиващ разтвор в края на деня.

VIII. СЪХРАНЕНИЕ И СРОК НА ГОДНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

- Всички компоненти на кита са стабилни до датата на срока на годност, посочен на опаковката, при температура на съхранение от 2 °C до 8°C преди отваряне или реконституиране.
- След реконституиране, калибраторите и контролите са стабилни за срок от 3 дни при температури 2-8°C. За по-дълги срокове на съхранение, се определя кратко и се съхранява при температура -20 °C за максимум 3 месеца. Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.
- Прясно приготвения Работен измиващ разтвор трябва да бъде използван същия ден.
- След първата употреба, трейсера е стабилен до изтичане срока на годност, ако се съхранява в оригиналния добре затворен флакон при температури 2-8°C.
- Промени във физическия вид на реагентите на кита индицират нестабилност или негодност.

IX. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИТЕ И ОБРАБОТКА

- Серумът трябва да се съхранява при температури 2-8°C.
- Ако тестът не се направи в рамките на 24 часа, се препоръчва съхранение при температура -20°C.
- Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.

X. ПРОЦЕДУРА

A. Общи бележки

Не използвайте кита или компонентите му след датата на изтичане срока на годност. Не смесвайте материали от различни партиди китове. Преди употреба оставете всички реагенти на стайна температура.

Внимателно смесвайте всички реагенти с пробите чрез нежно раклащане или въртеливо размесване. За да избегнете кръстосана контаминация, използвайте чист пипетен накрайник за еднократна употреба за добавянето на всеки реагент към съответната проба.

Високо прецизираните пипети или автоматичните пипети биха подобрали точността. Съобразявайте се с времето за инкубация.

Подгответе калибрационна крива за всяко измерване и не използвайте данни от предишни измервания.

B. Процедура

1. Означете две по две покритите епруветки за всеки калибратор, контрола и прока. За определяне на общия брой импулси, обозначете 2 нормални епруветки.
2. Разплактете за кратко време калибраторите, контролите и пробите и разпределете по 100 μl от всяко в съответните епруветки.
3. Разпределете 50 μl от анти-LH- ^{125}I трейсер във всяка епруветка, включително и в епруветките без покритие за общия брой импулси.
4. Разтърсете нежно с ръка стойката с епруветките, за да освободите някое остатъчно въздушно мехурче.
5. Инкубирайте за 1 час при стайна температура в клатещо устройство за епруветки (700 оборота в минута).
6. Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че пластмасовият край на аспиратора достига дъното на покритата епруветка, за да може да отстрани цялата течност.
7. Изплакнете епруветките с 2 ml от Измивачия разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Избягвайте получаването на пяна по време на добавянето на Работния измиващ разтвор.
8. Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Изплакнете отново епруветките с 2 ml от Измивачия разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси) и аспирирайте (или прелейте).

- След последното изплакване, оставете епруветките да стоят обрнати нагоре за две минути и аспирирайте останалите капчици от течността.
- Отчетете епруветките в гама брояч за 60 секунди.

XI. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

- Изчислете средното аритметично на резултатите, получени от две по две епруветки.
- На полулогаритмична или линейна диаграма върху графична хартия нанесете (на ординатата) броят на минута за всеки калибратор (общ брой импулси в минута) спрямо (на абсцисата) съответната концентрация на LH и начертайте калибрационна крива през калибрационните точки като не включвате точките, които очевидно не принадлежат към тази крива.
- Прочетете концентрациите за всяка контрола и проба чрез интерполиране върху калибрационната крива.
- Тези изчисления могат да се улеснят чрез асистирано редуциране на данните посредством компютър. Ако се използва автоматична обработка на резултатите, се препоръчва прилагането на 4- параметрова логистична функционална крива.

XII. ХАРАКТЕРНИ ДАННИ

Данните, изложени по-долу са само за илюстрация и никога не бива да се използват вместо истинската калибрационна крива.

LHsp-IRMA		сpm	B/T (%)
Общ брой		246440	100
Kалибратор			
	0.0 mIU/ml	207	0.1
	1.8 mIU/ml	533	0.2
	3.5 mIU/ml	1165	0.5
	9.9 mIU/ml	3821	1.6
	30.0 mIU/ml	12920	5.2
	97.0 mIU/ml	50053	20.3
	194.0 mIU/ml	93732	38.0

XIII. ИЗПЪЛНЕНИЕ И ОГРАНИЧЕНИЯ

A. Определен лимит

Двадесет нулеви калибратора са били изпитани заедно с комплект от други калибратори. Определения лимит, дефиниран като явната концентрация на две стандартни отклонения над средния брой при нулево свързване, е бил 0.2 mIU/ml.

B. Специфичност

Хормони с кръстосана реактивност са добавени към калибратор за ниски и високи стойности на LH. Явният LH отговор е измерен.

добавен хормон	LHsp CAL 1 mIU/ml	LHsp CAL 5 mIU/ml
-	1.8	97
FSH 300 mIU/ml	1.6	87
hCG 300000 mIU/ml	2.4	85
TSH 300 µIU/ml	3.6	100

B. Прецизност

ПО ВРЕМЕ НА ИЗПИТВАНЕТО				МЕЖДУ ИЗПИТВАНЕТО			
Серум	N	<X>±S.D. mIU/ml	CV (%)	Серум	N	<X>±S.D. mIU/ml	CV (%)
A	10	6.6±0.3	3.9	C	20	5.9±0.5	8.0
B	10	49.6±0.7	1.4	D	20	56.7±1.9	3.4

G. Точност

ВЪЗСТАНОВИТЕЛЕН ТЕСТ			
Проба	Добавен LH (mIU/ml)	Възстановен LH (mIU/ml)	Възстановяване (%)
1	0.5	0.7	130
	1.5	1.8	117
	5	4.5	89
	14	12.7	90
	46	46.1	100
	0.5	0.7	140
2	1.5	1.3	87
	5	4.7	94
	14	12.9	92
	46	43.8	95

ТЕСТ С РАЗРЕЖДАНЕ

Проба	Разреждане	Теоретична концентрация (mIU/ml)	Измерена концентрация (mIU/ml)
1	1/1	-	79.7
	1/2	39.9	41.1
	1/4	19.9	19.9
	1/8	10.0	10.1
	1/16	5.0	5.3
	1/32	2.5	2.2
	1/1	-	121.0
	1/2	60.5	53.0
2	1/4	30.3	27.9
	1/8	15.1	14.9
	1/16	7.6	7.8
	1/32	3.8	3.8

Пробите са били разредени с нулев калибратор.

Д. Закъснение

Както е показано по-долу, резултатите от изпитването остават точни дори когато пробата е разпределена 30 минути след като калибраторът е бил добавен към покритата епруветка.

	0'	30'
Проба 1 (mIU/ml)	2.2	2.3
Проба 2 (mIU/ml)	4.8	5.4
Проба 3 (mIU/ml)	53.6	54.6

E. Ефект на кукичката

Една проба с добавен LH до 1700 mIU/ml сигнализира за надхвърляне на най-високата концентрация на калибратора.

XIV. ВЪТРЕШЕН КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

- Ако резултатите, получени за Контрола 1 и/или Контрола 2 не са в рамките на нивото, указано на етикета на флакона, то резултатите не могат да бъдат използвани, освен ако не се предостави задоволително обяснение на това несъответствие.
- По желание, всяка лаборатория може да си направи собствен комплект от контролни пробы, които трябва да съхраняват замразени в кратни съотношения.
- Критериите за приемане на разликата от двойните резултати на пробите трябва да се опират на Добрата Лабораторна Практика.

XV. РЕФЕРЕНТИНИ ИНТЕРВАЛИ

Стойностите, показани по-долу, са предоставени само за напътствие; всяка лаборатория трябва да установи свои собствен нормален обхват на стойности.

Обхватът се изразява като 2.5% до 97.5% персентила.

Идентификация	Брой обекти	Средно (mIU/ml)	Обхват (mIU/ml)
Деца (от 0 до 12 години)			
• Момчета	20	0.2	0.0 – 1.4
• момичета	20	0.4	0.0 – 0.9
В пубертетна възраст (от 12 до 18 години)	18	2.9	0.1 – 10.6
Възрастни мъже	69	2.7	1.0 – 5.3
Жени			
Овулаторни цикли			
• Фоликулярна фаза (ден -12 до -6)	34	4.3	0.8 – 10.4
• Овулаторен пик (ден 0)	49	19.6	2.9 – 41.1
• Лutealna фаза (ден +6 до +12)	63	3.3	0.5 – 7.6
Постменопаузален период	53	31.2	14.4 – 52.8

XVI. ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Безопасност

Само за *in vitro* диагностика.

Този набор съдържа ^{125}I (полуживот: 60 дни), еmitиращ йонизиращи X (28 keV) и γ (35.5 keV) лъчения.

Тозиadioактивен продукт може да се пренася и да се използва само от оторизирани лица; покупката, съхранението, употребата и размяната наadioактивни продукти са предмет на законодателството на държавата, на крайния потребител. Този продукт не бива в никакъв случай да се прилага на хора или животни.

Боравенето с радиоактивния продукт трябва да се извършва в определена за целта територия, далеч от регулярни зони на преминаване. В лабораторията трябва да се поддържа дневник за получаването и съхранението на радиоактивни материали. Лабораторната екипировка и стъклария, които могат да бъдат контаминирани с радиоактивни субстанции, трябва да бъдат отделени с цел да се избегне кръстосана контаминация с различни радиоизотопи.

Всякакви радиоактивни пръски трябва да се почистват незабавно в съответствие с процедурите за радиационна безопасност. Радиоактивните отпадъци трябва да се изхвърлят, следвайки местните наредби и ръководства на властите, упражняващи юрисдикцията, над лабораториите. Придръжането към основните правила за радиационна безопасност осигуряват адекватна защита.

Човешките кръвни компоненти, включени в кита, са били тествани чрез одобрени от Европейски и/или FDA (Американска агенция по храните и лекарствата) методи и са дали отрицателен резултат за HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Няма известен метод, който да дава пълна гаранция за това, че човешките кръвни деривати не пренасят хепатит, СПИН или други инфекции. Ето защо, боравенето със реагентите, серумните или плазмените преби трябва да бъде в съответствие с местните процедури по безопасност.

Всички животински продукти и деривати са били събираны от здрави животни. Волските компоненти са с произход от страни, където BSE (волска серумна енцефалопатия) не е била установявана. Независимо от това, компонентите, съдържащи животински субстанции трябва да се третират като потенциално инфекционни.

Избягвайте какъвто и да било кожен контакт с реагентите (съдържат натриев азид като консервант). Азидът в този кит може да реагира с оловото и медта във водопроводните инсталации като по този начин се получават силно експлозивни метални азиди. По време на измивния етап, промийте със силна и обилна струя вода канализацията, за да избегнете формирането на азиди.

Не пушете, не пийте, не яжте и не си слагайте козметика в работната територия. Не пипетирайте с уста. Използвайте защитно облекло и ръкавици за еднократна употреба.

XVII. БИБЛИОГРАФИЯ

1. CLARKE J.J., CUMMINS J.T. (1987)

Пулсативност на репродуктивните хормони: физиологични основи и клинично приложение.

Bailliére's Clin. Endocrinol. Metab. 1:1

2. FILICORI M., SANTORO N., MERRIAN G.R., CROWLEY W.F. Jr, (1986)

Характеристика на физиологичните модели на епизодична гонадотропна секреция по време на целия човешки менструален цикъл.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 62:1136

3. MAIS V., CETEL N.S., MUSE K.N., QUIGLEY M.E., REID R.L., YEN S.S.C. (1987)

Хормонална динамика по време на прехода между лутеална и фоликуларна фаза.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 64:1109

4. SAWYER-STEFFAN J.E., LASLEY B.L., HOFF J.D., YEN S.S.C. (1982)

Сравнение между in-vitro биоактивността и имунореактивността на серумния LH при нормални цикли и при хипогонадни жени лекувани с ниски дози LH-RH.

J. Reprod. Fertil., 65:45

5. THOMAS C.M.G., SEGERS M.F.G. (1988)

Измерване на серумната hLH: hCG интерференция, оценена чрез два hLH-специфични IRMA набора.

Clin. Chem., 34:768

6. LOUMAYE E., VANKRIEKEN L., DEPREESTER S., PSALTI I., de COOMAN S., THOMAS K. (1989)

Хормонални промени, предизвикани от краткосрочното приложение на гонадотропин-освобождаващ хормон агонист по време на овариалната хиперстимулация при in-vitro fertилизация и последствията им върху ембрионалното развитие.

Fertil. and Steril., 51:105

7. VERMES I., BONTE H.A., SLUIS VEER G., SCHOEMAKER J. (1991)

Интерпретация на пет имунологични изследвания с моноклонални антитела на Lutropin и Follitropin: ефекти на нормализиране по C30 стандарт.

Clin. Chem., 37:415

8. DEMOULIN A., DUBOIS M., GERDAY C., GILLAND D., LAMBOTTE R., FRACHIMONT P. (1991)

Вариации на серумните концентрации на лутеинизиращия хормон след екзогенно прилагане на човешки хорионгонадотропин по време на овариалната стимулация.

Fertil. and Steril., 55:796

9. MASSA G., de ZECHER F., VANDERSCHUREN-LODEWYK K. (1992)

Серумни нива на имунореактивния Inhibine, FSH и LH при човешки кърмачета, родени преди и на термин.

Biol. of the Neonat., 61: 150

10. DE HERTOGH R., VANKRIEKEN L., THOMAS K. de GASPARO M. (1992)

Циркадни флуктуации на серумния общ ренин, инхибин и свързаните с тях хормони около средата на цикъла при здрави човешки индивиди от женски пол.

Hum. Reprod., 7:337

XVIII. ОБОБЩЕНИЕ НА ПРОТОКОЛА

	ОБЩА АКТИВНОСТ ml	КАЛИБРАТОРИ ml	ПРОБА (И) КОНТРОЛИ ml
Калибратори (0-6) Проби, контроли Трейсър	- 0.05	0.1 0.05	- 0.1 0.05
Инкубация	1 час при стайна температура с разклащане 700 оборота в минута		
Сепарация Измиващ разтвор Сепарация Измиващ разтвор Сепарация	- - - - -	аспирirайте (или прелейте) 2.0 аспирirайте (или прелейте) 2.0 аспирirайте (или прелейте)	
Броене	Отчетете епуретките за 60 секунди		

DIAsource LHsp-IRMA

[체외진단의료기기]

1. 제품개요

번호	항 목	내 용
1	품목명	내분비물질검사시약
2	제품명	DIAsourc LHsp-IRMA
3	허가번호	수인 15-291 호
4	사용목적	사람의 황체형성 호르몬 정량측정
5	포장단위	96 테스트/키트
6	저장방법	2-8 °C, 제조일로부터 63일 (9주)
7	사용기한	2-8 °C, 제조일로부터 63일 (9주)

2. 측정원리

DIAsource LHsp-Irma는 피복-시험관 분리법에 기초한 면역방사계수 측정법이다. 포획 항체인 Msbs1은 플라스틱 시험관의 아래쪽 내부에 부착되어 있다. 시험관에 참가된 표준용액과 검체는 처음에는 Msbs1에 대해 낮은 친화도를 보인다. ¹²⁵I으로 표지된 signal 항체인 Mab2의 첨가는 system을 완성하고 면역학적 반응을 유발한다. 세척 후, 시험관에 부착된 잔여 방사능은 항원 농도를 반영한다. 몇 개의 서로 다른 Msbs를 사용하는 것은 과특이도를 방지한다.

3. 제공되는 시약

번호	명칭	구성	Colour Code
1	Coated tube	2 X 48	Blue
2	Tracer Anti LH- ¹²⁵ I	1 vial, 5.5ml	Red
3	Calibrator 0	1 vial, 동결건조	Yellow
4	Calibrator 1-5	5 vial, 동결건조	Yellow
5	Wash Solution	1 vial, 10ml	Brown
6	Control I, II	2 vial, 동결건조	Silver

3. 측정방법

1) 검체 준비

- (1) 혈청은 2-8°C에 보관한다.
- (2) 측정이 24시간 안에 이루어지지 않는다면 혈청과 혈장 검체는 -20°C에 저장해야 한다.
- (3) 반복적인 냉동, 해동은 피한다.

2) 시약 조제

- (1) 표준용액 : 표준용액 0번은 2ml의 종류수로 재구성하고 나머지 표준용액은 1ml의 종류수로 재구성한다.
- (2) 정도관리 용액 : 0.5ml의 종류수로 재구성한다.
- (3) 세척액 : 70배로 희석한다. 균질화하기 위해 마그네틱 교반기를 이용한다.
- 3) 검사 방법 (* 자동화 장비 : Stratec SR300)
 - (1) 각 재구성 한 표준용액, 정도관리 용액, 트레이서를 pipetting stage에 준비한다.
 - (2) 검체를 100μl씩 준비하여 시험관 랙에 준비한다.
 - (3) 100μl의 표준용액, 정도관리용액, 트레이서 50μl를 차례대로 니들이 흡입한 후, 검체가 든 시험관에 분주한다. 준비된 시험관에 차례대로 분주한다.
 - (4) 분주가 끝난 시험관은 incubation stage로 옮겨져 1 시간동안 700rpm으로 쉐이킹 되면서 반응한다.
 - (5) 반응이 끝난 후 rinsing stage로 옮겨져 2ml의 세척액으로 각 시험관이 세척되고 모두 흡입단계까지 이루어진다.
 - (6) 시험관이 detection stage로 옮겨져 5개의 detector로 시험관의 결과 값을 읽어낸다.

4) 결과판정

(1) 자료정리

- ① 중복 측정값의 평균값을 구한다.
- ② LH농도에 대한 각각의 표준용액에서 얻어진 cpm으로 semi logarithmic 또는 linear 그래프에 표준곡선을 그린다.
- ③ 각 정도관리용액과 검체에 대해서 표준곡선에 삽입함으로써 LH농도를 판독한다.

(2) 참고치

구분	대상자수	평균값(mIU/ml)	범위(mIU/ml)
아동(0-12세) · 남자 · 여자	20	0.2	0.0-1.4
	20	0.4	0.0-0.9
사춘기(12-18세)	18	2.9	0.1-10.6
성인남성	69	2.7	1.0-5.3
여성 · 배란 주기 - 난포기 (월경 6-12일전) - 배란기 (월경 당일) - 황체기 (월경 6-12일후) - 폐경기 이후			
	34	4.3	0.8-10.4
	49	19.6	2.9-41.1
	63	3.3	0.5-7.6
	53	31.2	14.4-52.8

5. 완제품 시험규격

1) 외관검사

제조원의 품질관리표준지침서(문서번호 POCQ075)에 따라 시험하고, 확인양식(문서번호 FTPK004)에 기입하고 확인한다.

(1) 문서번호 ITPKKIP1311에 기입된 대로 구성품이 일치하는지 확인한다

(2) 제품 구성표의 lot와 키트안의 구성품이 일치하는지 확인

(3) 구성품과 키트의 유효기간을 확인

(4) 구성품의 라벨상태를 확인

(5) 구성품의 포장상태를 확인(용량, 물질 등)

(6) 서류가 맞게 있는지 확인(사용설명서, 품질서류 등)

(7) 박스에 라벨이 정확히 부착되어 있는지 확인

(8) 검사 후 담당자는 확인양식(FTPK004)에 기입하고 서명한다.

2) 성능시험 (제조원의 품질관리 표준지침서(문서번호 POCQ006)에 따라 시험한다.

(1) 총 계수는 허용범위 (320,000-340,000 cpm)내에 있어야 한다

(2) 표준용액 0의 결합률은 허용범위(na-0.08%) 내에 있어야 한다

(3) 표준용액 1의 결합률은 허용범위(0.13-0.32%) 내에 있어야 한다

(4) 표준용액 6의 결합률은 허용범위(36.7-68.2%) 내에 있어야 한다

(5) 키트 정도관리용액에서 얻어진 값이 허용범위 내에 있어야 한다

control I 3.5-6.5 mIU/ml

control II 35.0-65.0 mIU/ml

(6) 표준물질은 허용범위 내에 있어야 한다

Calibrator 1 : 0.7-1.3 mIU/ml

Calibrator 2 : 2.1-3.9 mIU/ml

Calibrator 3 : 7.0-13.0 mIU/ml

Calibrator 4 : 21-39 mIU/ml

Calibrator 5 : 70-130 mIU/ml

Calibrator 6 : 140-260 mIU/ml

비고 : 각 로트의 허용범위는 방사면역 측정을 위한 표준지침서(문서번호 CACQKIP1311)에 기록되어 있다.

(허용범위는 평균값의 ±3SD를 기준으로 측정된다).

6. 사용시 주의사항

1) 체외진단용으로만 사용하여야 하며, 체외진단용 이외 흡입이나 체내 투여 등을 금지한다.

2) 동 제품에 포함된 방사성동위원소 취급 시 다음 사항을 준수하여야 한다.

(1) 방사성동위원소는 지정된 장소에 보관하며, 관련 법령에 따라 자격을 갖춘자가 지정된 장소에서 사용한다.

(2) 방사성동위원소를 취급할 때 안전에 영향을 주는 불필요한 행동을 하지 않는다. (예, 음식 섭취, 흡연, 화장 등)

(3) 방사성동위원소를 포함한 시약을 분주해야 하는 경우, 입으로 파이펫팅 하지 않는다.

(4) 방사성동위원소를 취급할 때에는 장갑 및 실험복을 착용하며, 검사가 완료되면 손을 깨끗이 닦는다.

(5) 유출된 모든 물질은 즉시 닦아 낸 후 폐기 또는 취급에 관련된 소관 법령에 따라 처리하여야 하며, 방사성 물질의 오염이나 방사성 물질 등의 분실은 관련 법령에 정한 규정된 절차에 따라 처리한다.

3) 검사를 실시하기 전에 모든 제품(구성품 포함)은 해당 제품별 검사 온도 조건에 따라 실시한다.

4) 그밖에 방사성동위원소의 보관, 이동, 사용 및 폐기 등 취급에 관한 사항은 관련 법규 또는 규정에 따른다.

5) 본 kit 내의 혈액성분은 시험을 거쳤고, HbsAg, 항HIV 1와 항 HIV 2에 대한 반응은 없었다. 알려져 있는 어떠한 방법으로도 간염, AIDS, 감염성혈액 성분 같은 감염성 물질의 부재를 확신시킬 수 없다 그러므로 시약과 환자 검체의 취급은 병원내의 안전절차에 따라야 한다.

6) 시약이 피부에 접촉되지 않게 하라(요오드화나트륨 방부제). 본 kit 내의

DIAsource LHsp-IRMA [체외진단의료기기]

요오드화합물은 배관계통의 납과 구리와 반응하여 큰 폭발성을 가진
요오드화금속으로 변화할 수 있다. 세척 단계에서 요오드화합물의 생성을
막기 위해 흐르는 물로 배수관을 씻어 내도록 한다.

- 7) 방사성물질의 취득과 저장에 대한 일지는 실험실 내에 보관되어야 한다.
방사성 물질로 오염될 수 있는 서로 다른 방사성물질에 의한 교차 오염을
예방하기 위해 실험실 기구와 유리제품은 서로 분리 되어져야 한다.
- 8) 방사성 물질이 쓴아진 경우에는 방사선안전 절차에 따라 즉시 제염하여야
한다. 방사성 폐기물은 특정 규정과 실험실의 관할권을 가지고 있는
신고당국의 지침에 따라 처리되어 야만 한다. 방사선안전에 대한 기본
규칙의 준수는 충분한 방호를 제공한다.