

# PATHOZYME<sup>®</sup> LUTEINIZING HORMONE Ref OD357

## Immunoenzymatyczny test do ilościowego oznaczenia LH w ludzkiej surowicy. Przechowywać w temp. 2°C - 8°C. NIE ZAMRAŻAĆ. Do diagnostyki "in vitro".

### WPROWADZENIE

Hormon luteinizujący (LH) jest produkowany zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet przez przedni płat przysadki mózgowej, jako odpowiedź na wydzielane z podwzgórza hormony uwalniające hormon luteinizujący (LH-RH lub Gn-RH). Hormon LH jest również nazywany hormonem stymulującym komórki śródmiąższowe (ICSH) u mężczyzn i jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 30,000 daltonów. Hormon ten zbudowany jest z 2 połączonych kowalentnie różnych łańcuchów aminokwasowych, alfa i beta. Łańcuch alfa jest podobny do tego jaki występuje w TSH, FSH i hCG. Różnica pomiędzy tymi hormonami leży w składzie aminokwasowym pojedynczości beta, która uważana jest za czynnik odpowiadający za właściwości immunologiczne.

Wydzielanie LH u mężczyzn ma charakter epizodyczny, a jego zadaniem jest stymulacja komórek śródmiąższowych do produkcji testosteronu. Różnice w stężeniu LH u kobiet wynikają ze zmian zachodzących w czasie cyklu menstruacyjnego u zdrowych miesiączkujących kobiet. Stężenie LH zależy od oddziaływania hormonalnego podwzgórza i przysadki mózgowej. Poprzedzający owulację spadek poziomu progesteronu i estradiolu inicjuje każdy cykl miesiączkowy. Spadek poziomu hormonów, stymuluje podwzgórze do wydzielania gonadotropiny uwalniającej hormon (GnRH), która z kolei stymuluje przysadkę do zwiększonej produkcji i wydzielania FSH.

To podniesienie poziomu FSH pobudza kilka pęcherzyków jajnikowych podczas fazy folikularnej, a jeden z nich dojrzeje i będzie zawierał jajeczko. W czasie rozwoju komórki jajowej zaczyna się wydzielanie estradiolu, najpierw powoli, a później szybko wzrasta pomiędzy 12 a 13 dniem cyklu. LH wydzielane jest przez przysadkę w wyniku bezpośredniej stymulacji estradiolu, co objawia się wzrostem poziomu GnRH i FSH. Wzrost poziomu jest znakiem fazy przedowulacyjnej. Owulacja występuje ok. 12-18 godzin po tym jak stężenie LH osiąga maksymalny poziom.

Następuje uwolnienie jajeczka, tworzy się ciało żółte, które wydziela progesteron i estrogeny regulujące poziom LH poprzez mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego.

Faza lutealna następuje po owulacji, która charakteryzuje się wzrostem poziomu progesteronu i ponownym zwiększonym wyrzutem estradiolu, natomiast niskim poziomem LH i FSH. Niski poziom LH i FSH jest wynikiem działania ujemnego sprzężenia zwrotnego estradiolu i progesteronu.

Po zapłodnieniu, powstaje zarodek produkujący hCG, który stymuluje ciało żółte do produkcji progesteronu i estradiolu. Ciało żółte ulega zniszczeniu, jeśli nie nastąpi zapłodnienie, z towarzyszącym spadkiem poziomu progesteronu i estradiolu w czasie krwawienia. Podwzgórze inicjuje kolejny cykl w wyniku niskiego poziomu hormonów.

U pacjentów z hipogonadyzmem występuje wzrost stężenia LH w surowicy. Spadek produkcji hormonów steroidowych u kobiet jest spowodowany niedojrzałością jajników, pierwotną niewydolnością jajników, zespołem policystycznych jajników lub menopauzą. W tych przypadkach wydzielanie LH jest zaburzone.

Podobne wydzielanie LH występuje u mężczyzn z nieprawidłowym rozwojem jąder lub z wrodzonym brakiem jąder. W niektórych przypadkach u chorych z zespołem Klinefeltera i pierwotną niewydolnością jąder, może wystąpić wysokie stężenie LH. Jednakże wzrost poziomu LH nie będzie znaczący, jeśli wydzielanie androgenów będzie podjęte na nowo. Wzrost stężenia LH występuje również w zaburzeniach funkcji nerek, marskości wątroby, nadczynności tarczycy i w ciężkich przypadkach głodzenia. Brak wydzielania LH przez przysadkę powoduje obniżenie jego poziomu. Efektom jest niepłodność zarówno u mężczyzn jak i kobiet. Niski poziom LH może być również przyczyną spadku wydzielania GnRH z podwzgórza lub brakiem zdolności odpowiedzi przysadki mózgowej na GnRH.

Dlatego niski poziom LH może wskazywać na zaburzenia w funkcjonowaniu przysadki mózgowej lub podwzgórza, chociaż wg bieżących doniesień musi to być potwierdzone innymi badaniami. Oznaczanie poziomu LH w połączeniu z oznaczeniem FSH jest powszechnie wykorzystywane w diagnostowaniu różnych schorzeń takich jak: niedoczynność podwzgórza czy dysfunkcja przysadki i gonad.

Oznaczanie poziomu LH i FSH jest również wykorzystywane do monitorowania menopauzy, określenia szczytu owulacji i do monitorowania zastosowanej terapii hormonalnej.

Nie stwierdzono reakcji krzyżowych (wynik negatywny) dla następujących parametrów: HCG (WHO 2<sup>nd</sup> IS 61/2) do poziomu 1,000 mIU/ml, FSH (WHO 2<sup>nd</sup> IRP IRMG) do poziomu 125 mIU/ml i TSH (WHO 2<sup>nd</sup> IRP 80/558) do poziomu 62.5<sub>μ</sub>IU/ml.

### PRZEZNACZENIE

PATHOZYME LH jest testem, w którym wykorzystano metodę immunoenzymatyczną (EIA) do ilościowego oznaczenia LH w ludzkiej surowicy. Do użytku w laboratorium.

### ZASADA TESTU

Kubeczki mikroplastyki opłaszczane są specyficznymi, oczyszczonymi przeciwciałami anti-LH. Do testu należy użyć surowicy. Następnie dodawane są monoklonalne przeciwciała anti-LH znakowane peroksydazą chrzanową (koniugat enzymatyczny). LH obecne w surowicy badanego pacjenta wiąże się z przeciwciałami opłaszczonymi na ściankach kubeczka. Dodany do kubeczka koniugat enzymatyczny, również ulega przyłączeniu, tworząc tzw. kanapkę. Po inkubacji, nadmiar koniugatu zostaje odpłukany. Dodanie substratu (TMB) inicjuje reakcję barwną, która pojawia się w tych kubeczkach, w których obecny jest związany koniugat enzymatyczny, wskazujący na obecność LH w badanej próbce. Zatrzymanie reakcji enzymatycznej następuje po dodaniu rozcieńzonego kwasu solnego, a pomiar absorbancji dokonywany jest przy długości fali 450 nm. Stężenie LH jest wprost proporcjonalne do intensywności powstałego zabarwienia. Test został wykalibrowany względem standardu WHO, 1st IRP 68/40

### SKŁAD ZESTAWU

Ref  
OD357



<b>Microtitre Plate</b>	12 x 8 wells x 1
Dzielona mikroplastyka z kubeczkami opłaszczonymi specyficznymi przeciwciałami, umieszczona w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć.	
<b>Cal A</b>	0 mIU/ml
Standard referencyjny: ludzka surowica pozbawiona LH. Liofilizat. (Bezbarwny)	
<b>Cal B</b>	5 mIU/ml
Standard referencyjny: LH rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Liofilizat. (Bezbarwny)	
<b>Cal C</b>	15 mIU/ml
Standard referencyjny: LH rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Liofilizat. (Bezbarwny)	
<b>Cal D</b>	50 mIU/ml
Standard referencyjny: LH rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Liofilizat. (Bezbarwny)	
<b>Cal E</b>	100 mIU/ml
Standard referencyjny: LH rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Liofilizat. (Bezbarwny)	
<b>Cal F</b>	200 mIU/ml
Standard referencyjny: LH rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Liofilizat. (Bezbarwny)	
<b>Conj</b>	11ml
Anti-LH HRP Koniugat: koniugat anti-LH znakowany peroksydazą chrzanową. Gotowy do użycia. (Różowy)	
<b>Subs</b>	TMB
Roztwór substratu: 3,3', 5,5' tetrametylobenzyna w buforze octanowym. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
<b>Soln</b>	Stop HCl 1M
Odczynnik zatrzymujący reakcję: kwas solny rozcieńczony w czystej wodzie. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Instrukcja i druk protokołu.	

### MATERIAŁY WYMAGANE DO WYKONANIA OZNACZENIA, NIE ZALĄCZONE DO ZESTAWU

Pipety: 100 $\mu$ l, 200 $\mu$ l i 1000 $\mu$ l.  
Końcówki do pipet.  
Papier absorbacyjny.  
Czytnik mikroplastyk z filtrem 450 nm.  
Papier milimetrowy.  
Dokładnie umyte szkło laboratoryjne.

### ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Zestaw PATHOZYME LH zawiera materiał pochodzenia ludzkiego. Wykonano badania na obecność przeciwciał HCV, HIV I i II – wynik negatywny oraz HBsAg zgodnie z zatwierdzonymi przez FDA procedurami. Ponieważ żadne znane procedury nie dają całkowitej pewności, iż pozyskany materiał pochodzenia ludzkiego nie zawiera innych czynników zakaźnych, produkt należy traktować jako potencjalnie zakaźny i zaleca się obchodzić z nim ze szczególną ostrożnością i uwagą. Zaleca się również zachowanie środków ostrożności przy wykonywaniu oznaczenia traktując wszystkie odczynniki jako potencjalnie zakaźne. Nie spożywać.

Zestaw PATHOZYME LH nie zawiera substancji niebezpiecznych sklasyfikowanych przez aktualne, brytyjskie regulacje dotyczące substancji chemicznych. Jednakże zaleca się aby wszystkie odczynniki traktować jako potencjalny materiał niebezpieczny. Wszystkie zalecenia muszą być zgodne z lokalnymi rozporządzeniami.

Zestaw PATHOZYME LH zawiera rozcieńczony kwas solny jako odczynnik zatrzymujący reakcję – środek żrący. Używać z zachowaniem środków ostrożności. W przypadku kontaktu spłukać obficie wodą.

Odczynniki wchodzące w skład zestawu PATHOZYME LH zawierają 1% Proclin™ 300 jako konserwant, który może być środkiem toksycznym jeśli zostanie spożyty. W przypadku kontaktu spłukać obficie wodą i udać się po pomoc medyczną.

\*Proclin™ 300 jest chroniony znakiem towarowym firmy ROHM & HAAS Limited.

### PRZECHOWYWANIE

Odczynniki muszą być przechowywane w temperaturze 2°C - 8°C.

Test będzie spełniał standardy jakości podane w specyfikacji do końca daty ważności, która jest podana na zestawie i poszczególnych składnikach. Data ważności to ostatni dzień miesiąca podany na buteleczce i etykiecie zestawu. Nie używać odczynników przeterminowanych.

Nie poddawać odczynników działaniu zbyt wysokiej temperatury. Unikać wystawiania na bezpośrednie działanie światła słonecznego.

NIE ZAMRAŻAĆ ODCZYNNIKÓW (z wyjątkiem standardów) – zamrożenie powoduje nieodwracalny rozkład.

## PRZYGOTOWANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBK

Pobrać próbkę krwi żyłnej, odstawić do wykrzepnięcia i oddzielenia surowicy. Odwirować wykrzepioną krew i odciągnąć surowicę. Zaleca się używać świeżej surowicy.

Nie używać do badania próbek zhemolizowanych, mętnych lub lipemicznych, powyższe może fałszować wyniki.

Próbki mogą być przechowywane do 48 godzin w temperaturze 2°C - 8°C. W przypadku dłuższego przechowywania, próbkę zamrozić w temp. -20°C (możliwość przechowywania do 1 roku). Rozmrożoną próbkę wymieszać przed wykonaniem oznaczenia.

Nie używać azydku sodowego jako konserwantu, może hamować aktywność enzymu peroksydazy.

Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania próbek, powyższe może fałszować wyniki.

## PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przed użyciem wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C) i delikatnie wymieszać. Unikać spienienia.

Standardy: do każdej fiolki dodać po 1 ml wody destylowanej w celu rozpuszczenia liofilizatów. Odstawić na przynajmniej 20 minut przed użyciem. Rozpuszczone standardy są trwale przez 30 dni jeśli są przechowywane w temp. 2°C - 8°C. W celu dłuższego przechowywania szczelnie zamknięte standardy zamrozić w temp. -20°C. Przed użyciem rozmrożone standardy muszą być delikatnie wymieszane.

## OGRANICZENIA

Test jest nieważny jeżeli do badania użyto innego materiału niż surowica. Żadna modyfikacja procedury nie jest dozwolona. Interpretacja uzyskanych wyników powinna być przeprowadzona w oparciu o wywiad lekarski. Diagnoza nie może być oparta wyłącznie o jedno badanie kliniczne. W czasie ciąży występuje znaczny wzrost poziomu hCG dlatego nie zaleca się stosować testu **PATHOZYME LH** u pacjentek w czasie ciąży lub tuż po porodzie.

## PROCEDURA

- Przed wykonaniem oznaczenia wszystkie odczynniki i próbki badane doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C).
- Do każdej serii badań należy nastawić nową krzywą kalibracyjną. Umieścić odpowiednią ilość kubeczków w ramce mikro płytki. Zanotować pozycje standardów i próbek badanych na druku protokołu załączonym do zestawu.
- Nie używane kubeczki umieścić w szczelnie zamkniętej foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć i ponownie włożyć do lodówki (2°C - 8°C).
- Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 50µl standardów i próbek badanych.
- Do każdego kubeczka dodać po 100µl koniugatu.
- Mieszać delikatnie przez 30 sekund. Ten etap jest ważny dla procedury.
- Inkubować 45 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
- Po zakończeniu inkubacji wylać zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym. Upewnić się czy w pojemniku na zlewki znajduje się odpowiedni środek odkazający.
- Ręczne płukanie: napełnić kubeczki wodą destylowaną, do każdego kubeczka nalać minimum 300µl. Wyrzucić zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym. Przemycie puste kubeczki 5-krotnie wodą destylowaną.
- Energicznie uderzać kubeczkami na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku, tak aby usunąć resztki wody.
- Płukanie przy użyciu płuczki automatycznej: upewnić się, że płuczka dozuje 300µl płynu na każdy kubeczek oraz czy do pojemnika na zlewki został dodany odpowiedni środek odkazający. Przemycie puste kubeczki 5-krotnie wodą destylowaną. Po zakończeniu płukania usunąć resztki płynu poprzez energiczne uderzenie kubeczkami na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku.
- Do wszystkich kubeczków dodać po 100 µl roztworu substratu i delikatnie mieszać przez 5 sekund.
- Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
- Zatrzymać reakcję przez dodanie do każdego kubeczka po 100 µl odczynnika zatrzymującego reakcję.
- Delikatnie mieszać przez 30 sekund. Upewnić się, że barwa niebieska całkowicie uległa zmianie na barwę żółtą.
- Natychmiast odczytać wartości absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) na czytniku mikro płytek przy długości fali 450 nm.

## WYKRYWANIE I USUWANIE BŁĘDÓW

Test jest przeznaczony do użycia przez laboranta z minimum doświadczenia analitycznego.

Nie używać rozłożonych lub zanieczyszczonych odczynników.

Do pipetowania surowic używać jednorazowych końcówek w celu uniknięcia wzajemnego zanieczyszczenia próbek.

Zalecane jest nastawianie kalibratorów i próbek badanych w dubletach, chociaż nie koniecznie wymagane.

Próbki badane i kalibratory powinny być pipetowane z zachowaniem jednakowych warunków przeprowadzenia analizy.

Zaleca się nastawianie jednorazowo nie więcej niż 32 kubeczków w przypadku ręcznego pipetowania, pipetowanie standardów i próbek badanych powinno być zakończone w ciągu 3 minut. Nastawienie całej mikro płytki (96 kubeczków) jest możliwe w przypadku automatycznego pipetowania.

Po użyciu każdego odczynnika natychmiast zamknąć buteleczkę odpowiednią nakrętką.

Unikać wielokrotnego pipetowania (wielokrotnego otwierania) odczynników pobranych z magazynu – może to być przyczyną ich zanieczyszczenia.

Nie mieszać odczynników lub opłaszczonych kubeczków mikro płytki z różnych zestawów. Zachować szczególną uwagę aby nie dotykać ścian kubeczków w trakcie ich rozdzielania.

Nie dopuścić aby odczynniki podczas pipetowania spływały po ściankach kubeczków. Przed wykonaniem oznaczenia przenieść wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej (20°C - 25°C). Delikatnie wymieszać wszystkie odczynniki poprzez delikatne odwracanie lub obracanie.

Raz rozpoczęta procedura powinna być kontynuowana tak, aby podczas wykonywania oznaczenia kubeczki nie zostały wysuszone.

Nie zanieczyszczać roztworu substratu, może to spowodować, że cały zestaw nie będzie aktywny. Sprawdź precyzję i dokładność sprzętu laboratoryjnego używanego podczas procedury wykonania oznaczenia tak, aby być pewnym odtwarzalności wyników.

Nie używane paski, przed ponownym włożeniem do lodówki (temp. 2°C - 8°C), powinny być szczelnie zamknięte (zamknięcie typu zip-lock) w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć.

## OBLICZANIE WYNIKÓW

Obliczyc średnią wartość absorbancji ( $A_{450}$ ) dla każdego kalibratora i próbek badanych. Wykreślić krzywą kalibracyjną na papierze milimetrym odkładając na osi X: stężenia poszczególnych kalibratorów wyrażone w jednostkach mIU/ml, a na osi Y: odpowiadające im wartości absorbancji. Z wykresu krzywej kalibracyjnej odczytać wartości LH dla próbek badanych. Do odczytu użyć wyliczone wartości średnie.

Jeżeli wyniki kontroli lub znanych próbek badanych nie dają oczekiwanych wartości test należy uznać za nieważny.

Jeśli do obliczeń używamy aparatury z oprogramowaniem wówczas krzywą kalibracyjną obliczyć w oparciu o krzywą regresji.

## WARTOŚCI OCZEKIWANE I CZUŁOŚĆ

Uzyskana krzywa kalibracyjna powinna mieć kształt hiperboliczny zależny proporcjonalnie od uzyskanych wartości absorbancji w stosunku do odpowiednich wartości stężeń kalibratorów. Test można uznać za ważny jeżeli wartość absorbancji kalibratora A jest mniejsza niż 0,75, a wartość absorbancji kalibratora F jest większa niż 1,5.

Każde laboratorium powinno ustalić własne zakresy wartości prawidłowych dla swojej populacji. Zakresy wartości prawidłowych podane poniżej uzyskano w losowo wybranych surowicach pozyskanych z laboratoriów klinicznych działających w lecznictwie otwartym.

	wiek	Ilość badanych	średnia	LH(mIU/ml)	zakres
Mężczyźni	<10	25	1.3		<2.5
Mężczyźni	15-60	56	4.8		1.0 to 15.0
Kobiety	<10	25	1.1		<2.0
Kobiety	20-35	60	15.0		1.0 to 90.0
Kobiety	46-60	40	38.0		8.0 to 120.0

Minimalne wykrywane testem **PATHOZYME LH** stężenie ludzkiego LH wynosi 1 mIU/ml.

Nie stwierdzono wpływu innych czynników na wynik oznaczenia wykonanego testem **PATHOZYME LH** do poziomu 4 000 mIU/ml.

## OCENA WYNIKÓW

Test kalibrowano względem innych testów konkurencyjnych oraz względem wewnętrznych standardów. Współczynnik zmienności dla testu **PATHOZYME LH** jest mniejszy lub równy 10%.

Dla porównania testów Omega Pathozyme LH kit i Nichols Allegro LH IRMA Kit użyto próbek o wartościach LH pomiędzy 0.2 a 55.8 mIU/ml i uzyskano następujące wyniki.

Liczba próbek badanych	113
Współczynnik korelacji	0.958
Wartość nachylenia krzywej	1.115
Punkt przecięcia z osią OY	0.49
Wartość średnia testem Omega	10.1 mIU/ml
Wartość średnia testem Nichols Allegro	8.6 mIU/ml

Testy wykazują dobrą korelację.

## PIŚMIENNICTWO

- Knobil, E. The neuroendocrine control of the menstrual cycle. Rec. Prog. Horm. Res. 36:52-88; 1980.
- Harris, G.W., and Naftolin, F. The hypothalamus and control of ovulation. Brit. Med. Bull. 26:1-9; 1970.
- Shome, B., and Parlow, A.F. J. Clin. Endocrinol. Metab. 39:199-202; 1974.
- Shome, B., and Parlow, A.F. J. Clin. Endocrinol. Metab. 39:203-205; 1974.
- Uotila, M., Ruoslahti, E., and Engval, E. J. Immuno. Methods. 42:11-15; 1981.

## SKRÓCONA WERSJA WYKONANIA OZNACZENIA

- Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 50µl próbek badanych i standardów , a następnie do każdego kubeczka dodać po 100µl od koniugatu anty-LH. Delikatnie mieszać przez 30 sekund.
- Inkubować 45 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
- Wylać zawartość z kubeczków i przepłukać 5-krotnie wodą destylowaną.
- Do każdego kubeczka dodać po 100µl roztworu substratu. Delikatnie mieszać przez 5 sekund.
- Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
- Do każdego kubeczka dodać po 100µl odczynnika zatrzymującego reakcję.
- Natychmiast odczytać wartość absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) przy użyciu czytnika płytek przy długości fali 450 nm.

8085 ISSUE 4 Revised July 2010

© Omega Diagnostics Ltd., 2010 POLISH



OMEGA DIAGNOSTICS LTD  
Omega House, Hillfoots Business Village  
Alva, FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom  
odl@omegadiagnostics.co.uk  
www.omegadiagnostics.com  
AN ISO 9001 & 13485 CERTIFIED COMPANY