

PATHOZYME® LUTEINIZING HORMONE Ref OD357

Test ImunoEnzimatic (EIA) pentru determinarea cantitativă a LH

în serul uman.

Depozitați la 2°C - 8°C . NU CONGELAȚI.

Doar pentru diagnostic in-vitro.

INTRODUCERE

Hormonul Luteinizant (LH) este produs atât la bărbați cât și la femei la nivelul hipofizei anterioare, ca răspuns la hormonul de eliberare a LH (LH-RH) sau Gn-RH care este eliberat de hipotalamus. LH, numit și hormonul stimulant al celulelor interstițiale (ICSH) la bărbați, este o glicoproteină cu o greutate moleculară de 30.000 de daltoni. Este alcătuit din două lanțuri non-covalent asociate și diferite de aminoacizi: alfa și beta. Lanțul alfa este similar cu lanțul prezent și în hormonii TSH, FSH și hCG. Diferențele dintre acești hormoni se află în compoziția subunităților beta care sunt responsabile de diferențierea imunologică.

Secreția bazală de LH la bărbați este episodică și are ca funcție primară stimularea celulelor interstițiale ca să producă testosteron. Variația concentrațiilor de LH este secundară ciclului ovulator la femele sănătoase, fertile și depinde de evenimentele hormonale ce includ hipotalamusul și hipofiza.

Scăderea nivelurilor de progesteron și estradiol de la ovulația anterioară inițiază fiecare ciclu menstrual. Ca rezultat al scăderii nivelului de hormoni, hipotalamusul mărește secreția de factori eliberatori ai gonadotropinei (GnRF), care la rândul său stimulează hipofiza să mărească producția și secreția de FSH.

Aceste niveluri crescute de FSH stimulează câțiva folioli ovarieni în timpul fazei foliculare, iar unul din aceștia se va matura și va conține ovulul. Pe măsură ce foliculul se dezvoltă, se secretă estradiol, mai încet la început, însă mult mai rapid ulterior până în ziua 12 sau 13. LH este eliberat ca rezultat al stimulării directe a estradiolului de hipofiză, care la rândul ei va crește nivelurile de GnRF și FSH. Aceste evenimente marchează faza pre-ovulatorie.

Ovulația are loc la 12 - 18 ore după ce LH atinge nivelul maxim.

După eliberarea ovulului, se formează corpus luteum care secretă progesteron și estrogen care sunt regulatori de feedback pentru LH.

Faza luteală urmează fazei ovulatorii care este caracterizată de niveluri mari de progesteron, o a doua creștere a estradiolului și niveluri scăzute de LH și FSH. Nivelurile scăzute de LH și FSH sunt rezultatul efectelor de feedback negativ ale estradiolului și progesteronului.

După concepție, embrionul în curs de dezvoltare produce hCG, care determină corpul galben să continue producerea de progesteron și estradiol. Corpul galben regresează dacă sarcin nu apare iar scăderea corespunzătoare de progesteron și estradiol determină apariția ciclului menstrual. Hipotalamusul inițiază ciclul menstrual din nou ca rezultat al nivelurilor scăzute de hormon.

Pacienții care suferă de hipogonadism arată o concentrație crescută de LH seric. O scădere a producerii de hormon steroid la femei este rezultatul unor ovare imature, al insuficienței ovariene primare. Al bolii polichistice ovariene sau menopauzei și în aceste cazuri secreția de LH nu este controlată.

O pierdere asemănătoare de control a hormonului are loc la bărbați cu dezvoltare anormală a testiculelor sau cu anorhie. În cazul sindromului Klinefelter și al insuficienței testiculare primare, se pot găsi concentrații mari de LH. Cu toate acestea nivelurile de LH nu vor fi neapărat crescute dacă secreția de androgeni continuă. Concentrațiile mari de LH sunt de asemenea prezente în timpul insuficienței renale, cirozei, hipotirozismului și inaniției severe.

O lipsă de secreție a hipofizei anterioare poate determina niveluri scăzute de LH. Aceste niveluri pot determina infertilitate atât la bărbați cât și la femei. Nivelurile mici se pot datora unei secreții scăzute de GnRH de către hipotalamus sau unei inabilități a hipofizei de a răspunde la acești factori.

Cu alte cuvinte, nivelurile mici de LH pot indica disfuncția hipofizei sau hipotalamusului, însă sursa disfuncției trebuie confirmată de alte teste.

În colaborare cu testele pentru FSH, testele LH sunt realizate de rutină în diagnosticul diferențial al disfuncției hipotalamice, hipofizare și gonadale. Aceste niveluri hormonale mai sunt și pentru determinarea menopauzei, pentru a indica ovulația și pentru monitorizarea terapiei endocrine.

Următoarele preparate au fost testate ca negative: HCG (al II-lea Preparat de Referință Internațional OMS 61/2) la mai puțin de 1.000 mU/ml, FSH (al II-lea Preparat de Referință Internațional OMS HMG) la mai puțin de 125 mU/ml și TSH (al doilea Preparat de Referință Internațional 80/558) la mai puțin de 62,5 μU/ml.

UTILIZARE

PATHOZYME LH este un test ImunoEnzimatic (EIA) pentru determinarea cantitativă a hormonului luteinizant (LH) în serul uman.

A fi folosit doar de personalul medical.

PRINCIPIUL TESTULUI

Anticorpi specifici anti-LH sunt pregătiți, purificați și fixați pe godeurile de microtitrare. Se aplică serul de testare. Apoi se adaugă anticorpi monoclonali anti-LH marcați cu peroxidază din hrean (conjugat). Dacă LH uman este prezent în probă, se va combina cu anticorpii din godeuri și cu conjugatul enzimatic, astfel că moleculele de LH au o structură de LH flancate de faza solidă și anticorpii legați de enzima. După incubare, godeurile sunt spălate cu apă pentru a îndepărta anticorpii marcați și care nu sunt legați.

La adăugarea substratului (TMB), va apare o culoare doar în godeurile în care este prezentă enzima, indicând prezența LH. Reacția enzimatică este oprită de adăugarea de acid clorhidric diluat iar absorbanta este apoi măsurată la 450nm. Concentrația LH este direct proporțională cu intensitatea culorii probei.

Testul a fost calibrat cu Primul Preparat de Referință Internațional OMS 68/40.

CONȚINUT

Ref
OD357



Microtitre Plate	
Godeuri detașabile "câpșușite" cu anticorpi specifici conținuți într-o pungă de folie ce conține un desiccant.	12 x 8 godeur x 1
Cal A 0mIU/ml	1
Standard Referință: Ser uman fără LH. Liofilizat. (Incolor)	
Cal B 5mIU/ml	1
Standard Referință: LH diluat în ser uman. Liofilizat. (Incolor)	
Cal C 15mIU/ml	1
Standard Referință: LH diluat în ser uman. Liofilizat. (Incolor)	
Cal D 50mIU/ml	1
Standard Referință: LH diluat în ser uman. Liofilizat. (Incolor)	
Cal E 100mIU/ml	1
Standard Referință: LH diluat în ser uman. Liofilizat. (Incolor)	
Cal F 200mIU/ml	1
Standard Referință: LH diluat în ser uman. Liofilizat. (Incolor)	
Conj	11 ml
Conjugat Anti-LH HRP: Anti-LH conjugat de peroxidază hrean, Gata de lucru. (roz)	
Subs TMB	11ml
Soluție Substrat: 3,3', 5,5' Tetrametil Benzidină în tampon citrat. Gata de lucru. (Incolor)	
Soln Stop HCl 1M	11ml
Soluție Stopare: Acid clorhidric diluat în apă purificată. Gata de lucru. (Incolor)	

Broșură instrucțiuni și Fișa de înregistrare a datelor EIA. 1 + 1

MATERIALE NECESARE DAR CARE NU SUNT PREZENTE ÎN KIT

Micropipete: 100μl, 200μl și 1000μl
Virturi de pipetă de unică folosință
Hirtie absorbantă
Cititor de microplăci cu filtru de 450nm
Hirtie milimetrică
Sticlărie de laborator foarte curată.

PRECAUȚIUNI

PATHOZYME LH conține materiale de origine umană care au fost testate și confirmate negative prin proceduri aprobate de FDA pentru anticorpi HCV, HIV I și II și pentru HbsAg, la nivel de donor unic. Deoarece nici un test nu poate oferi o garanție completă că produsele derivate din surse umane nu vor transmite agenți infecțioși, se recomandă ca reactivii din acest kit să fie manipulați cu grijă și atenția corespunzătoare atât în timpul utilizării cât și sunt deșeurii. Nu ingerați.

Reactivii PATHOZYME LH nu conțin substanțe periculoase așa cum sunt definite de legislația Chimică a Marii Britanii (Informații și Ambalare substanțe periculoase pentru Furnizare). Toți reactivii trebuie totuși tratați ca substanțe cu potențial risc biologic atât când sunt folosite cât și când sunt deșeurii. Rezolvarea finală a deșeurilor trebuie făcută în conformitate cu legislația locală.

Soluția de Stopare PATHOZYME LH este acid clorhidric diluat și este deci corozivă. Manipulați cu grijă. În caz de contact cu tegumentul spălați cu grijă cu apă.

Reactivii PATHOZYME LH conțin Proclin™ 300* în concentrație de 1% ca și conservant. Este toxică atunci când este ingerată. În caz de contact, spălați bine cu apă de la robinet și consultați un medic.
* Proclin™ 300 este o marcă înregistrată a ROHM & HAAS Limited.

DEPOZITARE

Reactivii trebuie depozitați la temperaturi de 2°C - 8°C.

Data expirării este ultima zi a lunii menționate pe eticheta recipientului și pe ambalajul kit-ului. Performanța kit-ului va fi cea specificată pînă la data expirării menționată așa cum este determinată de la data producerii și după cum este menționat pe kit și componentele acestuia. Nu folosiți reactivii după data expirării.

Evitați expunerea reactivilor la temperatură excesivă. Nu expuneți reactivii la lumina directă a soarelui.

NU CONGELAȚI NICI UN REACTIV (cu excepția depozitării standardelor) deoarece acesta va fi iremediabil alterat.

RECOLTAREA ȘI PREGĂTIREA PROBEI

Recoltați o probă de sânge venos de la pacient și lăsați să se formeze și retracte cheagul. Centrifugați proba de sânge coagulat și colectați serul limpede. Este nevoie de ser proaspăt.

Nu folosiți pentru testare ser hemolizat, contaminat sau lipemic deoarece aceasta va influența nedorit rezultatele.

Serul poate fi depozitat la 2°C - 8°C timp de 48 de ore înainte de testare. Dacă este nevoie de depozitare pe durată mai lungă, puteți păstra serul la -20°C pe o durată de 1 an. Probele decongelate trebuie amestecate bine înainte de a fi utilizate.

Nu folosiți ca și conservant Azida sodică deoarece aceasta va inhiba sistemul enzimatic Peroxidază.

Nu congelați-decongelați în mod repetat probele – veți obține rezultate false.

PREGĂTIREA REACTIVILOR

Toți reactivii trebuie lăsați să ajungă la temperatura camerei (20°C-25°C) și amestecați ușor pentru a resuspenda latex-ul înainte de utilizare. Evitați formarea spumei.

Adăugați 1ml de apă distilată în fiecare flacon de standad pentru a reconstitui standardele liofilizate. Lăsați în repaus cel puțin 20 de minute și apoi amestecați ușor. Standardele reconstituite vor fi stabile timp de 30 de zile dacă sunt depozitate la 2°C - 8°C. Pentru o depozitare mai îndelungată fracționați și congelați la -20°C. Decongelați o singură dată. Standardele dezghețate trebuie amestecate înainte de testare.

LIMITELE UTILIZĂRII

Folosirea altor tipuri de probe, altele decât serul nu a fost validată pentru acest test. Nu există protocol de reutilizare pentru acest produs. Atunci când faceți interpretarea testului este recomandat să luați în considerare toate datele clinice. Diagnosticul nu trebuie să fie stabilit doar pe baza rezultatelor unui singur test clinic. Sarcina determină niveluri crescute de hCG și deci utilizarea diagnostică a **PATHOZYME LH** nu este recomandată în timpul sarcinii sau a perioadei imediat post-sarcină.

PROCEDURA DE TESTARE

1. Aduceți toate componentele kit-ului și serul de testat la temperatura camerei (20°C-25°C) înainte de a începe testarea.
2. Se recomandă rularea unui set de standarde la fiecare procesare de probe. Fixați numărul dorit de godeuri în stativ. Înregistrați poziția standardelor și a serului de testat pe Fișa de Înregistrare a Datelor EIA.
3. Stripurile nefolosite trebuie sigilate în punga de folie conținând desicant și plasate apoi la 2°C - 8°C.
4. Pipetați 50μl de Standarde și de ser de testat în godeurile stabilite.
5. Pipetați 100μl de Conjugat Anti-LH în fiecare godeu.
6. **Amestecați viguros timp de 30 de secunde.** Este foarte important ca în acest stadiu să amestecați complet.
7. Incubați placa timp de 45 de minute la temperatura camerei (20°C-25°C).
8. La sfârșitul perioadei de incubare, aruncați conținutul godeurilor răsturnând brusc conținutul plăcii cu partea superioară în jos deasupra unui container de deșeuri cu risc biologic și apoi loviți placa (cu partea superioară în jos) pe o bucată de hirtie absorbantă. Aveți grijă ca în recipientul pentru deșeuri să se afle un dezinfectant corespunzător.
9. Spălare Manuală. Umpleți godeurile cu minimum 300μl de apă distilată pentru fiecare godeu. Întraorțel brusc placa deasupra recipientului de deșeuri biologice. Loviți placa de hirtie absorbantă.
10. Loviți din nou placa (cu partea superioară în jos) de o bucată de hirtie absorbantă pentru a îndepărta toate picăturile de apă reziduală.
11. Spălare Automată: controlați ca 300μl de apă distilată să fie pipetați în fiecare godeu și ca în recipientul cu deșeuri să fie adăugat un dezinfectant potrivit. Spălați godeurile de 5 ori. După ce spălați îndepărtați excesul de lichid lovind placa inversată de o hirtie absorbantă.
12. Pipetați 100μl de Soluție Substrat în fiecare godeu și amestecați ușor timp de 5 secunde.
13. Incubați la întuneric timp de 20 de minute la temperatura camerei (20°C-25°C).
14. Opriți reacția adăugând 100μl de Soluție de Stopare în fiecare godeu.
15. Amestecați ușor timp de 30 de secunde pentru a asigura virarea completă a culorii albastre în galben.
16. Citiți imediat densitatea optică (până în 10 minute) folosind un cititor de microplăci cu un filtru de 450nm.

EVITAREA ERORILOR

Poate fi folosit de personalul cu minimă pregătire bazică de laborator.

Nu folosiți componente ale kit-ului care sunt deteriorate sau contaminate.

Folosiți un vîrf de pipetă de unică folosință pentru fiecare probă pentru a preveni contaminarea încrucișată.

Deși nu este necesară se recomandă rularea probelor și standardelor în duplicat.

Probele și standardele trebuie rulate simultan pentru a avea condiții de testare similare.

Se recomandă să nu folosiți mai mult de 32 de godeuri odată atunci când pipetați manual, deoarece pipetarea Standardelor și probelor trebuie să fie completă în decurs de 3 minute. Se poate folosi o placă completă de 96 de godeuri doar dacă este disponibilă pipetarea automată.

Puneți la loc capacul pe recipientele cu reactivi imediat după utilizare.

Evitați pipetarea repetată din reactivii de stoc, deoarece se poate produce contaminare.

Nu amestecați reactivii sau stripurile provenind de la kit-uri diferite. Atunci când pipetați aveți grijă să nu atingeți suprafața godeului. Nu pipetați reactivul pe partea laterală a godeului. Înainte de începutul testării, lăsați reactivii să ajungă la temperatura camerei (20° - 25°C). Amestecați ușor toți reactivii cu mișcări blinde de rotație.

Odată testarea pornită, godeurile nu trebuie să se usuce în cursul derulării testului.

Nu contaminați Soluția Substrat deoarece kit-ul va deveni nefuncțional.

Controlați precizia și acuratețea echipamentului de laborator folosit în timpul procedurii pentru a asigura rezultate reproductibile.

Strip-urile nefolosite ar trebui re-sigilate în punga de folie care conține desicant și apoi depozitate la 2°C - 8°C.

CALCULAREA REZULTATELOR

Calculați valoarea absorbantei medii (A_{550}) pentru fiecare set de standarde și seruri de testat. Creați o curbă standard făcând un grafic cu absorbanta medie pentru fiecare Standard în funcție de concentrația în mU/ml pe hirtie milimetrică, cu valorile absorbantei pe axa Y și concentrațiile pe axa X.

Folosiți valorile absorbantei medii pentru fiecare ser de testat pentru a determina concentrația corespunzătoare de LH în mU/ml din curba standard.

Dacă nivelurile controalelor sau ale probelor cu valori cunoscute nu dau rezultatele scontate, rezultatele testului trebuie considerate invalide.

Dacă folosiți un pachet software alegeți o curbă de regresie quadratică care să se potrivească.

VALORI PREDICȚIONATE ȘI SENSIBILITATE

Graficul produs de calibratori trebuie să aibă o formă hiperbolică cu densitatea optică (DO) citită la 450 nm proporțională cu concentrația lor. DO a calibratorului A trebuie să fie mai mică de 0,75 iar DO a calibratorului F mai mare de 1,5 pentru ca rezultatele testului să fie valide. Fiecare laborator trebuie să stabilească propriul domeniu de valori normale bazat pe populația de pacienți. Rezultatele oferite mai jos sunt bazate pe probe aleatorii recolate într-o policlinică.

Nr. de		LH(mU/ml)		
Vîrstă	Pacienți		Vîrstă	
Bărbați	<10	25	Bărbați	<10
Bărbați	15-60	56	Bărbați	15-60
Femei	<10	25	Femei	<10
Femei	20-35	60	Femei	20-35
Femei	46-60	40	Femei	46-60

Concentrația minim detectabilă de hormon luteinizant uman cu kit-ul **PATHOZYME LH** este estimată a fi de 1mU/ml.

Cu **PATHOZYME LH** au fost măsurate concentrații de LH de 4.000 mU/ml fără efect de prozonă (Hook).

DATE DE EVALUARE

Calibrat cu competitori importanți și cu standarde interne.

Coefficientul de variație al **PATHOZYME LH** este mai mic sau egal cu 10%. La o evaluare dintre kit-ul **PATHOZYME LH** produs de Omega și kit-ul Nichols Allegro LH IRMA pentru probe cu niveluri între 0,2 și 55,8 mU/ml au fost generate următoarele date.

Număr de Probe	113
Coefficient de Corelare	0,958
Pantă	1,115
Intercept	0,49
Medie Omega	10,1 mU/ml
Medie Nichols Allegro	8,6 mU/ml

Aceste kit-uri au avut o bună corelare.

BIBLIOGRAFIE

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

GHID RAPID AL PROCEDURII DE TESTARE

1. Pipetați 50μl de Standard sau probe și 100μl de Conjugat Anti-LH în fiecare godeu și apoi amestecați bine timp de 30 de secunde.
2. Incubați timp de 45 de minute la temperatura camerei (20°C-25°C)
3. Aruncați conținutul godeurilor și spălați de cinci ori cu apă distilată.
4. Adăugați 100μl de Soluție Substrat în fiecare godeu și amestecați bine timp de 5 secunde.
5. Incubați la întuneric timp de 20 de minute la temperatura camerei (20°C-25°C)
6. Adăugați 100μl de Soluție de Stopare în fiecare godeu și amestecați ușor timp de 30 de secunde.
7. Citiți imediat (nu mai târziu de 10 minute) densitatea optică folosind un cititor de microplăci cu un filtru de 450nm.

8085 ISSUE 4 Revised August 2004 **ROMANIAN**

© Omega Diagnostics Ltd., 2004



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