

LH

Prueba ELISA para la determinación cuantitativa de Hormona Luteinizante (LH) en suero humano

Presentación del estuche

REF	53010	96 determinaciones	Estuche completo
IVD			

Uso previsto

La Hormona Luteinizante (LH) es una hormona glicoproteica de aproximadamente 30 kD, sintetizada en la hipófisis. Fisiológicamente esta hormona actúa en las gónadas donde es esencial para su desarrollo y función. Durante la primera fase del ciclo menstrual, la LH estimula el desarrollo del folículo de Graaf. La ovulación se induce por los niveles más altos de LH. La utilidad clínica y diagnóstica de la medición de FSH para la evaluación de la homeostasis que regula la fertilidad a través del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal ha sido bien establecida. La determinación de la LH es indispensable para monitorear pacientes sometidas a procedimientos de fertilización *in vitro*.

Principio - Sandwich EIA -

El análisis LH ELISA está basado en la clásica técnica ELISA sandwich. Como un análisis de segunda generación, hace uso del sistema de alta afinidad Biotina-Estreptavidina. Los micropocillos ELISA se recubren con Estreptavidina. En la primera parte de incubación, las muestras, calibradores o controles, conjugado enzimático (anti-LH marcado con Peroxidasa) y un segundo anticuerpo monoclonal biotinado anti-LH están mezclados para formar el complejo sandwich el cual se une a la superficie de los pocillos por la interacción de la biotina con la estreptavidina inmovilizada. Al final de la incubación, el exceso de conjugado enzimático y de anticuerpos monoclonales son eliminados por lavado. Se agrega TMB/Sustrato (etapa 2) y el color resultante, el cual se transforma a amarillo después de detener la reacción con la solución de parada se mide fotométricamente. El incremento de la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de LH en la muestra. La concentración se evalúa por medio de una curva de calibración la cual se establece con los calibradores provistos en el estuche.

Reactivos y contenidos

MIC	12	Tiras de Micropocillos (en portatiras) Tiras divisibles de 8 pocillos, recubiertos con estreptavidina	
CAL	A - F 6x2,0ml	Calibradores (tapa blanca) listos para usar, en suero humano Concentraciones de LH: 0 (A), 5,0 (B), 25,0 (C), 50,0 (D), 100,0 (E) y 200 (F) UI/l.	
CON	13 ml	Conjugado enzimático (tapa blanca) listo para usar, coloreado amarillo anti-LH (cabra), marcado con HRP, anti-LH (monoclonal, ratón), biotinado	pH 7,45 ± 0,1 1,0 µg/ml
WS	20 ml	Solución de Lavado (tapa negra) Concentrado para 1000 ml Buffer MOPS salino	pH 8,8 ± 0,4 5 mmol/l
SA	7,0 ml	Reactivo Substrato A (tapa amarilla) 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) Buffer Acetato de Sodio	pH 3,5 ± 0,1 4 mmol/l 0,05 mol/l
SB	7,0 ml	Reactivo Substrato B (tapa azul) Peróxido de Urea Hidrógeno Buffer Acetato de Sodio	pH 4,5 ± 0,1 10 mmol/l 0,05 mol/l
STOP	7,5 ml	Solución de Parada (tapa roja) Acido sulfúrico	0,5 mol/l
	1	Tira adhesiva	

Agentes preservantes: Concentración total < 0,04%

Notas de seguridad

No ingerir los reactivos. Evitar el contacto con los ojos, piel y membranas mucosas. Todas las muestras de pacientes y **CAL** deberían ser manipulados como posibles agentes potencialmente infecciosos. **CAL** han sido encontrados negativos para HBsAg y anticuerpos contra VHC y VIH 1 + 2 en los donantes. Usar ropa protectora y guantes desechables según las buenas prácticas de laboratorio (GLP).

Todos los materiales contaminados con muestras o **CAL** deben inactivarse por métodos aprobados (autoclavado o tratamiento químico) según las regulaciones aplicables.

STOP irrita los ojos, la piel y membranas mucosas. En caso de contacto, lavar intensamente con abundante agua y consultar un médico.

Estabilidad

Los reactivos son estables hasta las fechas de expiración señaladas en las etiquetas individuales cuando se almacenan a 2...8°C.

Después de abiertos, los reactivos deben almacenarse a 2...8°C y utilizarse dentro de 60 días (ver "Nota").

MIC

- están selladas en un envase de aluminio con un desecante.
- Antes de abrir, las tiras deben estar a **temperatura ambiente**.
- Las tiras no utilizadas deberán ser devueltas al envase con cierre y almacenadas con el desecante. Las tiras almacenadas de esta manera a 2...8°C pueden ser usadas hasta la fecha de expiración (ver "Nota").
- No tocar el anillo superior o el fondo de los micropocillos con los dedos.

Preparación de reactivos

Todos los reactivos deben estar a **temperatura ambiente** (15...25°C) antes del uso. Los reactivos que no están en uso deberían siempre estar almacenados a 2...8°C.

Solución de trabajo de Lavado **WASH**

- **Una ligera turbidez que puede aparecer en el concentrado **WS** se disuelve completamente durante la dilución.**
- Diluir **WS** a 1000 ml con agua desionizada fresca en un envase apropiado. Enjuagar el envase varias veces.
- Estabilidad: **60 días a 15...25°C.**

Solución de trabajo Substrato **SUB**

- **Para un uso prolongado:** preparar cantidad necesaria mezclando porciones iguales **SA** y **SB**. Usar solamente un envase plástico limpio previamente enjuagado con agua desionizada.
- **Utilizar dentro de 30 días:** Verter el contenido de un frasco de **SA** en un frasco de **SB** y mezclar. Almacenar de 2...8°C.
- ¡Manipular **SUB** cuidadosamente y evitar la contaminación! ¡No utilizar si es de color azul!
- Almacenar la solución protegida de la luz intensa.
- Estabilidad: **30 día a 2...8°C.**

Muestra

Suero

No usar muestras hiperlipémicas o hemolizadas.

Las muestras pueden almacenarse por 5 días a 2...8°C, o por hasta 30 días a -20°C. **Congelar y descongelar solamente una vez.** Al descongelar una muestra debe ser homogeneizada. Eliminar el material particulado por centrifugación o filtración.

Procedimiento

Seguir el procedimiento exactamente como se describe.

Notas de uso

U1: No mezclar o usar componentes de diferentes números de lote. No mezclar tapas de envases (riesgo de contaminación). No usar reactivos después de sus fechas de expiración.

U2: No usar reactivos que pueden ser contaminados o que tienen aspecto diferente o olen diferentemente que normal.

U3: Notar el reparto **CAL**, las muestras y los controles cuidadosamente en la hoja provista en el estuche.

U4: **MIC** - sacar el número requerido y colocarlos firmemente en el portatiras.

U5: **Analizar** cada **CAL**, control o muestra **por duplicado**. **Pipetearlos en el fondo** de los micropocillos.

U6: **Siempre deben agregarse los reactivos en el mismo orden y tiempo para minimizar diferencias en los tiempos de reacción entre los micropocillos.** Es importante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debería exceder de 10 minutos. De lo contrario pipetear la curva **CAL** en las posiciones indicadas en la mitad del intervalo de la serie. Si se emplea más de una placa, repetir la curva de calibración para cada placa.

U7: Evitar/remover burbujas de aire antes de las incubaciones y lecturas de absorbancia.

U8: **SUB** inicia y **STOP** termina una reacción cinética. **Evitar la luz intensa** durante el desarrollo del color.

U9: **MIC** - **Después de cada pipeteo agitar suavemente durante 20-30 sec.** sin verter las soluciones para asegurar una buena mezcla. Si está disponible, mezclar en un mezclador de pocillos (p.ej. HUMAREADER).

Procedimiento de lavado

El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente producirá una mala precisión o absorbancias falsamente elevadas.

L1: Remover las tiras adhesivas, aspirar el contenido, agregar [WASH], aspirar después de aproximadamente 30 sec. de enjuague y repetir el lavado.

L2: En el caso de lavadores automáticos, se deben cebar con [WASH] y lavar los pocillos 3 veces. Asegurarse que el lavador llene los pocillos completamente y los aspire eficientemente después de 30 sec. (líquido remanente: < 15 µl).

L3: Después del lavado, **remover el líquido remanente** invirtiendo los micropocillos sobre papel absorbente.

Esquema de pipeteo

Los reactivos y las muestras deberían estar a temperatura ambiente antes del uso.		
Etapa 1	Pocillo [µl]	
	A1...D2 Calibradores	E2... Muestras
[CAL] A-F; en duplicado	50	--
Muestras, Controles; en duplicado	--	50
[CON]	100	100
Mezclar y cubrir [MIC] con cinta adhesiva		
Incubar por 60 min. a 20...25°C		
Lavar 3 veces como se describe (ver L1 – L3)		
[WASH]	300	300
Etapa 2		
[SUB]	100	100
Incubar por 15 min. a 20...25°C (ver U8)		
[STOP]	50	50
Mezclar cuidadosamente		
Medir la absorbancia a 450 nm lo más pronto posible o dentro de 10 min. después de terminar la reacción usando una longitud de onda de referencia de 630-690 nm (si está disponible).		

Validación de la prueba

Los resultados son válidos si se cumplen los siguientes criterios :

Absorbancia máxima ([CAL] F) D.O. $\geq 1,5$

Concentración LH al 80% absorbancia máx. = 120 ± 25 UI/l

Concentración LH al 50% absorbancia máx. = 60 ± 10 UI/l

Concentración LH al 20% absorbancia máx. = 19 ± 4 UI/l

Cálculo

Una curva de calibración se usa para interpolar la concentración de LH en las muestras desconocidas.

- [CAL] - Graficar la absorbancia de los duplicados contra la correspondiente concentración de LH en UI/l sobre papel milimetrado lineal (no promediar los duplicados de los calibradores antes de graficar).
- Trazar la mejor curva a través de los puntos graficados.
- Para determinar la concentración de LH en una muestra desconocida (S), localizar el promedio de absorbancia de los duplicados sobre el eje vertical del gráfico, hallar el punto de intersección sobre la curva, y leer la concentración (en UI/l) en el eje horizontal del gráfico (ver ilustración).

Interpretación de resultados

La concentración de LH depende de diversos factores además de la homeostasis hipofisiaria. Así, la determinación de LH por sí sola no es suficiente para evaluar el estado clínico.

La LH se suprime por estrógenos, aunque en mujeres que toman anticonceptivos orales los niveles de LH pueden ser normales.

Ayuno excesivo y pérdida de peso pueden producir tendencia a bajas concentraciones de LH.

Valores esperados de LH durante el ciclo menstrual normal

Fase del Ciclo	LH [UI/l]
Fase Folicular	0,8 – 10,5
Mitad del ciclo	18,4 – 61,2
Fase Lútea	0,8 – 10,5
Postmenopausia	8,2 – 40,8

En hombres, se han reportado valores de LH de 0,7 – 7,4 UI/l

Cada laboratorio debería determinar sus propios rangos de referencia utilizando los instrumentos/equipos, métodos de colección de sangre y técnicas de análisis usuales empleados normalmente en dicho laboratorio.

Datos de rendimiento

La prueba LH ELISA tiene una sensibilidad analítica de aproximadamente 0,8 UI/l LH.

Las muestras con concentraciones sobre 200 UI/l pueden diluirse con suero masculino normal y ser reanalizadas. Para obtener la concentración de estas muestras se multiplica el resultado por el factor de dilución.

El análisis se estandarizó según el estándar OMS (IRP 68/40) para LH.

Los datos típicos de ejecución de la prueba pueden ser encontrados en el informe de verificación, accesible vía

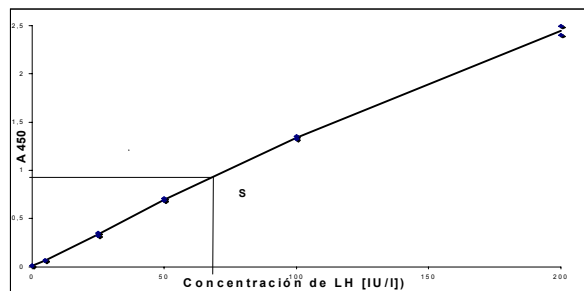
www.human.de/data/gb/vr/el-lh.pdf o
www.human-de.com/data/gb/vr/el-lh.pdf

Nota

Los componentes del estuche son estables hasta la expiración aún después de abiertos. Sin embargo, la posibilidad de una contaminación está directamente relacionada con el número de tomas del reactivo. Por lo tanto, el límite de 60 días en viales abiertos se fijó por razones de seguridad.

La manipulación debería siempre estar de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio (GLP*). ¡Los criterios de validación del análisis deben cumplirse siempre!

(*Esto incluye: Colocar la tapa debida en el vial y cerrarlo firmemente / Sacar de los viales de stock solamente los reactivos necesarios para la corrida si entraran en contacto con otras soluciones contaminantes como lo son las muestras, etc. / Las soluciones de stock siempre deben regresarse a 2...8°C si no se usan.)



Referencias

- Kosasa T. S., Measurement of Human Luteinizing Hormone, Journal of Reproductive Medicine **26**, 201-6 (1981)
- Danzer H. *et al.*, Maternal Serum Human Chorionic Gonadotropin Concentrations and Fetal Sex Predictions, Fertility and Sterility **34**, 336-40 (1980)
- Braunstein G. D. *et al.*, Serum Human Luteinizing Hormone Levels through Normal Pregnancy, American Journal of Obstetrics and Gynecology **126**, 678-81 (1976)
- Goldstein D. P. and Kosasa T. S., The Subunit Radioimmunoassay for LH Clinical Application, Gynecology **6**, 145-84 (1975)
- Batzer F., Hormonal Evaluation of Early Pregnancy, Fertility and Sterility **34**, 1-12 (1980)
- Braunstein G. D. *et al.*, First-Trimester Luteinizing Hormone Measurements as an Aid to the Diagnosis of Early Pregnancy Disorders, American Journal of Obstetrics and Gynecology **131**, 25-32 (1978)

EL-LH
INF 5301001 E
06-2004-12



Human