

**INTENCIÓN DE USO**

Inmunoensayo para la detección cuantitativa de la enzima de la hormona luteinizante, en suero humano.

Agente de diagnóstico in vitro para uso exclusivo de laboratorio clínico o de gabinete.

**RESUMEN Y APLICACIÓN**

La hormona Luteinizante (LH) es producida tanto en hombres como en mujeres por la glándula pituitaria anterior en respuesta a la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) liberada por el hipotálamo. La LH, también llamada Hormona Estimulante de las Células Intersticiales en los hombres, es una glicoproteína con un peso molecular de aproximadamente 30.000 Daltons. Se compone de dos cadenas disimilares de aminoácidos no covalentes, alfa y beta. La cadena alfa es similar a la encontrada en la Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH), en la hormona folículo-estimulante (FSH) y la gonadotropina coriónica humana (HCG). La LH estimula la ovulación y la producción de esteroides ováricos en la mujer. En el varón, la LH controla la secreción de testosterona en las células de Leydig. La LH se eleva en la fase lútea del ciclo menstrual, en casos de hipogonadismo primario, en tumores de la hipófisis y durante la menopausia.

**DESCRIPCION**

LH ELISA es un método en fase sólida sándwich directo, las muestras diluidas con el conjugado anti-LH HRP se añaden a los pocillos recubiertos con anticuerpo monoclonal de LH subunidad beta. LH en el suero del paciente se une al anticuerpo monoclonal LH, un segundo anticuerpo también anti-LH se une a la LH. Proteínas no unidas con el conjugado HRP son lavadas por una solución de lavado. Tras la adición del sustrato, la intensidad de color es proporcional a la concentración de LH en las muestras.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Placa con 96 pozos.	1
2. Estándares 6 viales	0.5ml.
3. Reactivo de enzima conjugada, 1 vial.	12 ml.
4. Sustrato TMB: 1 vial	12ml.
5. Solución de Frenado: 1 vial.	12ml.
6. Solución de Lavado Concentrado 20X: 1 vial.	25ml.

**MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS**

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector Microelisas con lente a 450nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadrulado.

**ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD**

1. Almacene el kit a una temperatura de entre 2°C - 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Todos los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre y cuando las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

**CUIDADOS Y PRECAUCIONES**

1. Potencial de los materiales de riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales. "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984.
2. No pipetee con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo.
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Es recomendable que los estándares, controles y muestras de suero se corran por duplicado
5. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este pueden dar datos no válidos.

**RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA**

1. Recolecte sangre por venopunción y separe el suero de inmediato.
2. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigere la muestra a (2-8° C) por cinco días. En caso de exceder dicho plazo, congele a -20° C hasta un mes.
3. Evite múltiples descongelamientos de la muestra.
4. Previo al ensayo, la muestra deberá ser debidamente descongelada y mezclada.
5. Evite utilizar muestras con exceso de lípidos.

**PREPARACIÓN DEL REACTIVO**

1. Preparar la solución de lavado a 1X añadiendo el contenido de la botella (25mL a 20X) a 475mL de agua destilada o desionizada.

**PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO**

Previo al ensayo, permita que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18°-26°C). Mezcle suavemente los reactivos antes de su uso.

1. Corte el número de pozos a utilizar.
2. Vierta 25 µl de LH estándares, especímenes y controles en los pozos apropiados.
3. Vierta 100 µl de Conjugado Enzimático.
4. Cubra e incube a temperatura ambiente por 60 minutos (18-23°C).
5. Retire el líquido de los pocillos. Enjuague y lave los pocillos tres veces con 300 uL de solución de lavado 1X. Golpee la placa sobre el papel absorbente.
6. Vierta 100 µl de reactivo TMB a todos los pocillos.
7. Incube a temperatura ambiente por 15 minutos.
8. Frene la reacción agregando 50 µl de solución de frenado a cada pozo. Sacuda gentilmente para facilitar el mezclado de la solución.
9. Lea la densidad óptica a 450nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

**CÁLCULO DE RESULTADOS**

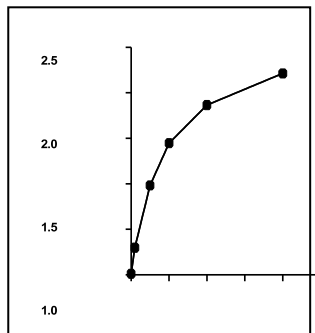
La curva estándar se construye de la siguiente manera:

1. Compruebe el valor del estándar de LH en el vial del estándar. Este valor puede variar de un lote a otro. Asegúrese de revisar el valor en cada kit. Véase el ejemplo de estándar adjunto.

- Para construir la curva estándar, trace la absorbancia de los estándares de LH (eje vertical) frente a concentraciones normales de LH (eje horizontal) en un papel de gráfica lineal. Dibuje la mejor curva a través de los puntos.
- Lea la absorbancia de los controles y cada muestra desconocida de la curva. Registre el valor de cada control o muestra desconocida.

#### Ejemplo de curva Standard

Standard	OD (450 nm)
Standard 1 (0 mIU/ml)	0.011
Standard 2 (5 mIU/ml)	0.278
Standard 3 (25 mIU/ml)	0.988
Standard 4 (50 mIU/ml)	1.543
Standard 5 (100 mIU/ml)	2.104
Standard 6 (200 mIU/ml)	2.681



#### VALORES ESPERADOS Y SENSIBILIDAD

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales sobre la base de una muestra representativa de la población local. Los siguientes valores de LH pueden usar rangos utilizados solo como guía:

	HOMBRES (mIU/ml)	MUJERES (mIU/ml)
Adulto	1.5- 9.3	FASE FOLICULAR: 1.9-12.5
		MEDIO CICLO : 8.7-76.3
		FASE LUTEA : 0.5-16.9
		POST-MEPAUSIA : 5.0- 52.3

#### LIMITACIONES DE LA PRUEBA

- Los resultados obtenidos mediante la utilización de este kit sirven solo como ayuda en el diagnóstico y deben ser interpretados en relación a la historia clínica del paciente, síntomas y otros procedimientos de diagnóstico.
- No utilice ácido de sodio como preservante ya que inhibe la actividad de la enzima HRP.

#### PERFORMANCE

##### 1. Correlación con un kit ELISA de referencia:

Un total de 110 muestras de suero fueron analizadas utilizando el presente kit ELISA y otro kit de referencia. Fueron obtenidos los siguientes resultados:

Correlación	Pendiente	Intercepción
0.98	0.9	0.37

#### 2. Precisión:

##### Intra Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media mIU/ml	Desvío Estandar	Coefficiente de Variación (%)
1	16	47.2	2.92	6.18
2	16	16.3	1.24	7.6
3	16	1.7	0.18	10.58

##### Inter Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media mIU/ml	Desvío Estandar	Coefficiente de Variación (%)
1	10	46.1	3.75	8.13
2	10	15.6	1.69	10.83
3	10	1.9	0.22	11.57

#### 3. Sensibilidad:

La sensibilidad de esta prueba fue al calcular la media más dos desvíos estándar del punto de estándar cero, veinte veces en la misma prueba.

Suero	No. de Réplicas	Media mIU/ml	Desvío Estandar	Media + 2SD (Sensibilidad)
Zero Standard	20	0.09	0.015	0.12 mIU/ml

#### 4. Recuperación:

Cantidades controladas de LH fueron agregadas al suero con una baja concentración de LH.

Valor Esperado (mIU/ml)	Recupero (mIU/ml)	Porcentaje de recupero
8	8.2	103
16	14.4	90
32	33.5	104

#### REFERENCIAS

- Frank JE; Faix JE; Hermos RJ; Mullaney DM; Rojan DA; Mitchell ML; Klein RZ Thyroid function in very low birth weight infants: effects on neonatal hypothyroidism screening. J Pediatr 1996; 128(4):548-54.
- Thakur C; Saikia TC; Yadav RN. Total serum levels of triiodothyronine (T3) thyroxine (T4) and thyrotropine (LH) in school going children of Dibrugarh district: an endemic goitre region of Assam. Indian J Physiol Pharmacol 1997; 41(2):167-70.
- Morimoto K; Inouye K.A sensitive enzyme immunoassay of human thyroid-stimulating hormone (LH) using bispecific F (ab')<sub>2</sub> fragments recognizing polymerized alkaline phosphatase and LH. J Immunol Methods 1997; 205(1):81-90.
- Maes M; Mommen K; Hendrickx D; Peeters D; D'Hondt P; Ranjan R; De Meyer F; Scharp'e S. Components of biological variation, including seasonality, in blood concentrations of LH, TT3, FT4, PRL, cortisol and testosterone in healthy volunteers. Clin Endocrinol (Oxf) 1997; 46(5):587-98.