

INTENCIÓN DE USO

El equipo LH CLIA se destina para la determinación cuantitativa de concentración de LH en el suero humano.

RESUMEN Y APLICACIÓN

La Hormona Luteinizante (LH) se produce en los hombres y las mujeres en la glándula pituitaria anterior en respuesta a la hormona liberadora de hormona luteinizante (LH-RH o Gn-RH), que es liberada por el hipotálamo. La LH, es esencial para la reproducción tanto en hombres como en mujeres. En mujeres, al momento de la menstruación, la FSH (hormona foliculo estimulante) inicia el crecimiento folicular, afectando las células de la granulosa específicamente. Con el incremento de estrógenos, el receptor de LH es también expresado en el foliculo maduro que produce un incremento de estradiol. En hombres, la LH actúa sobre las células de Leyding de los testículos y es responsable de la producción de testosterona, entonces la LH puede ser medida si los niveles de testosterona son bajos. En hombres y mujeres, la prueba de LH y FSH son solicitadas como parte del tamizaje de infertilidad, sospechas de problemas de la pituitaria o desordenes gonadales cuando una mujer está teniendo problemas para embarazarse o cuando se sospecha de desórdenes de la pituitaria u ovarios. En hombres la LH es una glicoproteína con un peso molecular de aproximadamente 30,000 Daltons. Está compuesta por dos cadenas de aminoácidos no similares, alfa y beta. La cadena alfa es similar a la que encontramos en la TSH humana (hormona estimulante de la tiroides), FSH y HCG (hormona gonadotropina coriónica). En mujeres, después de la concepción, el desarrollo del embrión produce HCG, la cual causa que el cuerpo lúteo continúe liberando progesterona y estradiol. El cuerpo lúteo desaparece si no ocurre la fecundación e implantación, y la caída de los niveles de progesterona y el estradiol resultan en la menstruación. La falta de secreción por la pituitaria anterior puede causar niveles bajos de LH. Como puede ser esperado, valores bajos de LH pueden indicar varias disfunciones de la pituitaria o del hipotálamo, mientras que la fuente actual del problema debe ser confirmado por otras pruebas.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El Kit de prueba cuantitativa de LH se basa en un ensayo inmunoenzimático de fase sólida. El sistema de ensayo utiliza un anticuerpo anti-LH para la inmovilización de la fase sólida (pocillos) y otro monoclonal (ratón) anti-LH en la solución de conjugado anticuerpo-enzima (peroxidasa de rábano). La muestra permite reaccionar de manera simultánea con los anticuerpos, dando lugar a que las moléculas de LH se puedan intercalar entre la fase sólida y los anticuerpos ligados a la enzima. Después de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, se lavan los micropocillos para eliminar los anticuerpos etiquetados no unidos. Posteriormente, se debe añadir una solución de sustrato quimioluminiscente y se deben leer las unidades relativas de luz (RLU) en un Luminómetro. La intensidad de la emisión de luz es proporcional a la cantidad de la enzima presente, y está directamente relacionada con la cantidad de LH en la muestra. Por referencia a una serie de normas de LH analizadas de la misma manera, se cuantifica la concentración de LH en la muestra desconocida.

MATERIALES SUMINISTRADOS

1. Placa con 96 micropocillos recubiertos con anticuerpo.
2. Set con estándares de referencia: 1, 2.5, 10, 40, 160 mIU/ml (1° IRP, 68/40), liofilizados.
3. Reactivo conjugado enzimático, 6.0 ml
4. Buffer de lavado 2 bolsas con 5gr c/u.
5. Reactivo A en Quimioluminiscencia, 6.0 ml
6. Reactivo B en Quimioluminiscencia, 6.0 ml

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Agua destilada.
2. Pipetas de precisión, 0.04 - 0.2 ml, 1.0 ml
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Tubo de vidrio o frascos para mezclar el reactivo A y B.
5. Lector de micropocillos
6. Mezclador Vórtex o equivalente.
7. Papel absorbente.
8. Papel para gráfica.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Deberá prepararse un suero de una muestra de sangre entera obtenida por técnicas médicas aceptables. Este kit es para uso con muestras de suero sin aditivos.

ALMACENAMIENTO DEL KIT DE PRUEBA

1. El kit de prueba (**antes de ser abierto**) debe conservarse a 2 - 8°C sobre el recibo y la placa de microtitulación, las cuales deben de ser conservadas en una bolsa completamente sellada con algunos absorbentes para minimizar la exposición de humedad en el aire. El kit de prueba puede utilizarse durante la fecha de caducidad señalada (un año desde la fecha de fabricación). Por lo tanto, se debe consultar la etiqueta del paquete para conocer la fecha de caducidad.
2. El kit de prueba (**abierto**) permanecerá estable hasta la fecha que se muestra, siempre y cuando sea almacenado según lo prescrito anteriormente.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Todos los reactivos deben alcanzar la temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.
2. Para preparar la solución de sustrato, se debe hacer una mezcla 1:1 del Reactivo A con el Reactivo B antes de usarlo. Mezclar con suavidad para asegurar una mezcla completa. Desechar el exceso sobrante después de su uso.
3. Reconstituir cada estándar liofilizado y controles con agua destilada (Se deben ver las etiquetas para reconstituir el volumen). El material reconstituido debe reposar al menos 20 minutos. Los controles y estándares reconstituidos deben almacenarse sellados a una temperatura de 2 - 8°C.
4. Diluir 1 bolsa de buffer de lavado concentrado 5gr con 500 ml de agua destilada. Mezclar bien antes de usar.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Asegurar el número deseado de micropocillos recubiertos en el soporte. Realizar una hoja de datos con la identificación de la muestra.
2. Pipetear 50 µl de estándares, muestras y controles dentro de los micropocillos adecuados.
3. Dispensar 50 µl del reactivo conjugado enzimático a cada uno de los micropocillos.
4. Mezclar completamente durante 30 segundos. Es muy importante tener la mezcla completa en este paso.
5. Incubar a temperatura (37°C) durante 60 minutos.
6. Retire la mezcla de incubación sacudiendo el contenido de la placa en un recipiente de desechos.
7. Enjuague y sacuda 5 veces los pocillos con buffer de lavado (1X).
8. Acomode los micropocillos sobre el papel absorbente para quitar las gotas de agua residual.
9. Dispensar 100 µl de solución de sustrato de Quimioluminiscencia en cada micropozo. Mezclar suavemente durante 5 segundos.
10. Se debe incubar 5 min en la recámara del lector, después, se deberán leer los micropozos mediante un lector de micropocillos de Quimioluminiscencia. (Entre 5 y 20 minutos después de la dosificación de los sustratos).

La mínima concentración detectable de hormona luteinizante para este ensayo se estima en **2 mIU/ml**.

NOTAS IMPORTANTES

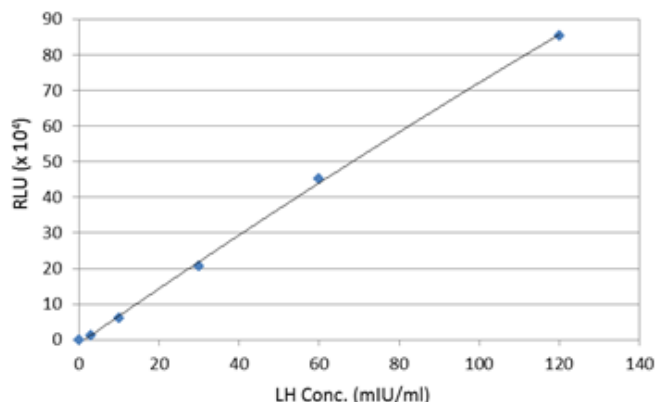
1. El procedimiento de lavado es fundamental. El insuficiente lavado producirá mala precisión y lecturas falsamente elevadas de RLU.
2. Si hay burbujas en los micropocillos, se crearán lecturas falsas. Utilice agua destilada para eliminar las burbujas antes de añadir el sustrato.

CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Calcular el promedio de las unidades relativas de luz de cada una de las lecturas realizadas (RLU) para cada conjunto de estándares de referencia, controles y muestras.
2. Se recomienda utilizar un software especial, el cual sea adecuado para calcular los resultados. El mejor ajuste para la curva utilizada en los ensayos es la regresión cuadrática o la 4^o regresión de parámetro. Si el software no está disponible, se deberá construir una curva estándar mediante la representación de la media (RLU) obtenida para cada referencia estándar contra la concentración de LH en mIU/ml sobre papel milimetrado lineal. Se debe colocar los valores de RLU en el eje vertical (y) y la concentración en el eje horizontal (x).
3. Usando el valor promedio de absorbancia para cada una de las muestra, se deberá determinar la correspondiente concentración de LH en mIU/ml de la curva estándar.

EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR

| LH (mIU/ml) | RLU |
|-------------|--------|
| 1 | 1108 |
| 2.5 | 2891 |
| 10.0 | 11482 |
| 40.0 | 52261 |
| 160.0 | 196509 |



VALORES ESPERADOS Y SENSIBILIDAD

Cada laboratorio debe establecer sus propios rangos normales basados en la población de pacientes. Los resultados a continuación se basan en muestras de laboratorio clínico de pacientes seleccionados al azar:

LH (mIU/ml)

| | | | Rango |
|--------|------------------|--|----------|
| Hombre | | | 1-12.5 |
| mujer | Follicular phase | | 1.2-12.7 |
| Mujer | Mid-cycle | | 15.5-90 |
| Mujer | Luteal phase | | 0.5-14.6 |
| Mujer | postmenopausal | | 15.6-72 |

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Existen algunas limitaciones de la prueba.

1. Así como en todas las pruebas diagnósticas, un diagnóstico clínico definitivo no debe basarse en los resultados de una sola prueba, se deben realizar diferentes pruebas por un médico y después se deben determinar que los resultados del laboratorio han sido evaluados.
2. Los estudios han implicado posibles interferencias en los resultados del inmunoensayo en pacientes con anticuerpos antinucleares y factor reumatoide. Las muestras de suero de los pacientes que han recibido infusiones que contienen anticuerpos monoclonales de ratón (con fines diagnósticos o terapéuticos), pueden contener anticuerpos a la proteína de ratón (HAMA). Aunque se han añadido algunos agentes para evitar interferencias, no se puede garantizar que se eliminarán todos los efectos posibles.
3. El procedimiento de lavado es fundamental. El insuficiente lavado producirá mala precisión y absorbancias falsamente elevadas. El uso de suficiente agua para el lavado podría resultar en una mejor y mayor lectura de fondo.

REFERENCIAS

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