

PATHOZYME[®] LUTEINIZING HORMONE Ref OD357

Inmunoanálisis de enzima para la detección cuantitativa del LH en suero humano

Almacene entre los 2°C y los 8°C. NO CONGELE

Para uso IN VITRO únicamente

INTRODUCCIÓN

La hormona Luteinizante (LH) es producida tanto por hombres como por mujeres por la glándula pituitaria anterior en respuesta a la hormona luteinizante cuando produce hormona (LH-RH o Gn-RH) la cual es producida por el hipotálamo. La LH, que también es llamada hormona estimulante de célula intersticial (ICSH) en los hombres es una glicoproteína con un peso molecular de 30.000 daltons. Está compuesta por dos cadenas aminoácidas disímiles asociadas y no covalentes alfa y beta. La cadena alfa es similar a la encontrada en la hormona estimulante de la Tiroides (TSH), la hormona estimulante del folículo (FSH) y la gonadotropina coriónica humano. (hCG).

La diferencia entre estas hormonas consiste en la composición aminoácida de las sub unidades beta situación responsable de la diferenciación inmunológica. La secreción basal del LH en los hombres es episódica y tiene la función primaria de estimular las células intersticiales para producir testosterona. La variación de la concentración del LH en mujeres, está sujeta al ciclo ovulatorio de mujeres que menstrúan saludablemente y depende de los eventos hormonales que involucran al hipotálamo y las glándulas pituitarias. La disminución de los niveles de progesterona y de estradiol de la ovulación precedente inicia cada ciclo menstrual. Como resultado de la disminución de los niveles de hormona, el hipotálamo aumenta la secreción de los factores que sueltan la gonadotropina (GnRF) la cual a su turno, estimula la pituitaria a aumentar la producción del FSH y su secreción.

Estos niveles en aumento del FSH estimulan varios folículos durante la fase folicular y uno de estos madurará para alojar el huevo. Mientras se desarrolla el folículo, se secreta estradiol, lentamente al principio pero aumenta rápidamente desde el día 12 o 13. Como resultado de esto, se suelta el LH debido a la estimulación directa del estradiol en la pituitaria la cual a su turno aumenta los niveles de GnRF y FDH. Estos eventos marcan la fase pre ovulatoria. La ovulación ocurre aproximadamente de 12 a 18 horas después de que el LH alcanza los máximos niveles.

Después de que el huevo es implantado se forma el corpus luteum el cual secreta la progesterona y el estrógeno los cuales son retroalimentadores de los reguladores del LH.

La fase Luteal sigue a la fase ovulatoria la cual está caracterizada por altos niveles de progesterona, un segundo aumento de estradiol y niveles bajos de LH y de FSH. Los niveles bajos del LH y del FSH son el resultado de los efectos de una retroalimentación negativa del estradiol y de la progesterona.

Después de la concepción, el embrión produce el hCG el cual causa el corpus luteum para continuar la producción de progesterona y estradiol. El corpus luteum retrocede si no ocurre el embarazo y las correspondientes caídas de niveles de progesterona y estradiol en la menstruación. El hipotálamo inicia una vez más el ciclo menstrual como resultado de los niveles bajos de hormona. Los pacientes que sufren de hipogonadismo, muestran concentraciones elevadas de LH en su suero. Una disminución en la producción de la hormona esteroide en mujeres, es el resultado de ovarios inmaduros, falla ovárica primaria, enfermedad poliquística del ovario o la menopausia; y en estos casos la secreción del LH no es regulada.

Una pérdida similar de la regulación hormonal ocurre en hombres con desarrollo testicular anormal o con ANORCHIA. En los casos del síndrome Klinefelter y de la falla testicular primaria, pueden encontrarse altas concentraciones del LH. Sin embargo, los niveles de LH no necesariamente serán elevados si la secreción de los andrógenos continúa. Las concentraciones aumentadas de LH están también presentes durante la falla renal, la cirrosis, el hipotiroidismo e inanición severa.

Una falta de secreción por la pituitaria anterior puede causar niveles bajos de LH. Estos niveles bajos pueden dar como resultado la infertilidad tanto en hombres como en mujeres. Los niveles bajos también pueden deberse a una secreción disminuida del GnRH por el hipotálamo o la inhabilidad de la glándula pituitaria de responder a estos factores. Por consiguiente, los niveles bajos de LH pueden indicar una disfunción de la pituitaria o del hipotálamo aunque la fuente actual de la disfunción debe ser confirmada por otras pruebas. Los análisis LH son rutinariamente desempeñados en conjunto con los análisis FSH en el diagnóstico diferencial de las disfunciones del hipotálamo, de la pituitaria y gonadal. Tales niveles de hormona son también usados para determinar la menopausia, determinar con precisión la ovulación y el monitoreo de la terapia endocrina.

Las siguientes preparaciones se analizaron como negativo: El HCG (2do, estándar internacional de referencia WHO 61/2) a menos de 1000 mIU/ml, FSH (2do estándar internacional de referencia WHO preparación HMG) a menos de 125 mIU/ml y TSH (2do, estándar internacional de referencia 80/558) a menos de 62.5µl IU/ml.

USO PREVISTO

El PATHOZYME LH es un inmunoanálisis de enzima (EIA) para la determinación cuantitativa de la hormona Luteinizante (LH) en suero humano. Para uso profesional únicamente.

EL PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Se preparan y purifican anticuerpos específicos anti-LH y se cubren los pozos de microtitration con ellos. Luego se añade el suero de prueba. Enseguida se añade el anti-LH monoclonal etiquetado con enzima conjugada de peroxidasa de rábano. Si el LH humano está presente en la muestra, se combinará con el anticuerpo en el pozo y el conjugado de enzima dando como resultado que se produzca un "sandwich" entre la fase sólida y los anticuerpos de enzima ligados. Después de la incubación, se lavan los pozos con agua destilada para retirar anticuerpos etiquetados no ligados. Luego, al añadir el sustrato (TMB) se desarrollará un color pero únicamente en aquellos donde se encuentre presente la enzima, indicando con esto, la presencia del LH. Se detiene a continuación la reacción de la enzima al añadir ácido clorhídrico diluido. Inmediatamente se lee la absorción a 450nm. La concentración del LH es directamente proporcional a la intensidad del color de la muestra de prueba. Esta prueba ha sido calibrada con el IRP de WHO 68/40.

CONTENIDO

Ref
OD357



Microtitre Plate			12 x 8 pozos x 1
Pozos rompibles cubiertos con anticuerpo específico dentro de una bolsa de hojilla de aluminio con desecante.			
Cal A	0mIU/ml		1
Estándar de referencia: Suero humano libre de LH. Liofilizado (Incoloro)			
Cal B	5mIU/ml		1
Estándar de referencia: LH diluido en suero humano. Liofilizado (Incoloro)			
Cal C	15mIU/ml		1
Estándar de referencia: LH diluido en suero humano. Liofilizado (Incoloro)			
Cal D	50mIU/ml		1
Estándar de referencia: LH diluido en suero humano. Liofilizado (Incoloro)			
Cal E	100mIU/ml		1
Estándar de referencia: LH diluido en suero humano. Liofilizado (Incoloro)			
Cal F	200mIU/ml		1
Estándar de referencia: LH diluido en suero humano. Liofilizado (Incoloro)			
Conj			11 ml
Anti-LH Conjugado HRP: Anti-LH conjugado a Peroxidasa de rábano, Listo para su uso (rosado)			
Subs TMB			11ml
Solución de sustrato: 3,3', 5,5' Tetrametil Bencidina en buffer de citrato. Listo para su uso. (Incoloro)			
Soln Stop HCl	1M		11ml
Solución de paro: Ácido clorhídrico diluido en agua purificada. Listo para su uso (Incoloro)			
Hojilla de instrucciones y hoja de registro de datos (EIA)			1 + 1

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

Micropipetas: 100µl, 200µl, 1000µl
Puntas de pipetas desechables
Papel absorbente
Lector de micro placa con filtro 450nm
Papel gráfico
Cristalería de laboratorio limpia

PRECAUCIONES

El PATHOZYME LH contiene materiales de origen humano los cuales han sido examinados y confirmados como negativo para los anticuerpos HCV, HIV I y II y para el HBsAg usando procedimientos de examen aprobados a nivel de donante sencillo. Ya que ninguna prueba puede ofrecer una seguridad total de que los productos derivados de fuente humana no puedan transmitir agentes infecciosos, se recomienda que los reactivos de este kit sean manejados con cuidado extremo y atención durante su uso y disposición. No los ingiera.

Los reactivos del PATHOZYME LH no contienen sustancias peligrosas según lo definen las regulaciones químicas británicas (Información de peligro y empaque para el suministro). Sin embargo, todos los reactivos deben tratarse como potencialmente bio peligrosos tanto en su uso como en su disposición. La eliminación final debe estar en concordancia con la legislación local.

La solución de paro del PATHOZYME LH es ácido clorhídrico diluido, por consiguiente, es altamente corrosivo. Manéjelo con cuidado. En caso de contacto, lave totalmente con agua abundante.

El PATHOZYME LH contiene un 1% de Proclin 300* como preservativo el cual puede ser tóxico si se ingiere. En caso de contacto, lave totalmente con agua corriente y busque atención médica.

*Proclin® 300 es una marca registrada de ROHM & HAAS Limited.

ALMACENAMIENTO

Los reactivos deben almacenarse dentro de un rango de temperatura entre los 2°C y los 8°C.

La fecha de vencimiento es el último día del mes y se encuentra marcado en la botella y en la etiqueta del kit. El kit se desempeñará según las especificaciones escritas hasta la fecha de vencimiento determinada, la cual es tomada teniendo en cuenta la fecha de fabricación del producto. No use los reactivos pasada la fecha de vencimiento.

Debe evitarse la exposición de los reactivos a temperaturas extremas ni a luz solar directa.

NO CONGELE LOS REACTIVOS (a excepción del almacenamiento estándar) ya que al hacerlo, se producirá un daño irreversible.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL ESPECIMEN

Obtenga una muestra de sangre venosa del paciente y permita que se forme un coágulo y que se retraiga. Centrifugue la muestra de sangre coagulada y recolecte el suero claro. Se requieren muestras de suero frescas.

No use suero lipémico ni hemolizado ni contaminado para la prueba ya que estas circunstancias afectarán adversamente los resultados.

El suero puede almacenarse entre los 2°C y los 8°C hasta por 48 horas antes de efectuar la prueba. Si se requiere un almacenamiento más prolongado, almacene a -20° hasta por 1 año. Las muestras dertidas, deben mezclarse completamente antes de efectuar las pruebas.

No use como preservativa la Asida de Sodio ya que este producto podrá inhibir el sistema de enzima de peroxidasa.

No haga ciclos de congelar-descongelar repetitivos pues esto causará resultados falsos.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (20° C a 25° C) y mezclados suavemente antes de usarse. No induzca la espuma

Añada 1 ml de agua destilada a cada ampolla estándar para reconstituir los estándares liofilizados. Deje en reposo por al menos 20 minutos. Almacene sellado a -20°C cuando no se usa. Los estándares rehidratados permanecen estables por 30 días entre los 2° y los 8°C. Para un almacenamiento a largo plazo y alicuota a -20°C. Congele-descongele solo una vez. Los estándares descongelados deben mezclarse antes de efectuar la prueba.

LAS LIMITACIONES DEL USO

El uso de muestras diferentes al suero no han sido validadas para esta prueba. No existe un protocolo de re utilización para este producto. Al efectuar una interpretación de la prueba, recomendamos vehementemente tener en cuenta todos los datos clínicos. No debe hacerse un diagnóstico únicamente basado en los resultados de un solo análisis clínico. El embarazo arroja niveles elevados del hCG por consiguiente, el uso diagnóstico del PATHOZYME LH no se recomienda usarse durante el embarazo ni inmediatamente después del parto.

PROCEDIMIENTO DEL ANÁLISIS

- Permita que los componentes del kit y el suero de prueba lleguen a temperatura ambiente (20°C a 25°C) antes de efectuar las pruebas.
- Debe correrse solo un juego de estándares para cada grupo de suero de prueba. Asegure el número deseado de pozos cubiertos en el recipiente. Registre la posición de los estándares y el suero de prueba en la hoja de registro de datos suministrada.
- Las tiras no usadas deben introducirse en la bolsa de hojilla de aluminio con desecante y sellarse con la cremallera zip-lock antes de colocarse dentro de la temperatura de 2°C a 8°C.
- Distribuya 50µl de los estándares y el suero de prueba a los pozos asignados.
- Distribuya 100 µl del conjugado Anti-LH a cada pozo.
- Mezcle completamente por 30 segundos. Este paso de mezcla es extremadamente importante.
- Incubé la placa durante 45 minutos a temperatura ambiente (20°C a 25°C).
- Al terminar el periodo de incubación, elimine el contenido de los pozos sacudiéndolos hacia un contenedor bio peligroso. Enseguida golpee firmemente los pozos contra papel absorbente. Asegure un contenido adecuado de desinfectante presente en el contenedor bio peligroso.
- Lavado a mano: Llene los pozos con un mínimo de 300 µl de agua destilada por pozo. Sacuda el contenido de la placa hacia un contenedor bio peligroso. Luego golpee firmemente los pozos contra papel absorbente.
- Golpee los pozos firmemente contra papel absorbente o contra una toalla de papel para retirar todo residuo de agua en gotitas.
- Lavado a máquina: Asegúrese de distribuir 300 µl de agua destilada por cada pozo y que se añada un desinfectante apropiado en la botella de recolección de desperdicio. Lave los pozos vacíos 5 veces. Después del lavado, retire el exceso de líquido golpeando los pozos firmemente contra papel absorbente o contra una toalla de papel para retirar toda agua residual en gotitas.
- Distribuya 100 µl de solución de sustrato a cada pozo y agite suavemente por 5 segundos.
- Incube en la oscuridad por 20 minutos a temperatura ambiente (20°C a 25°C).
- Detenga la reacción añadiendo 100 µl de solución de paro a cada pozo.
- Agite suavemente por 30 segundos para asegurar que el color azul cambia completamente a amarillo.
- Lea de forma inmediata la densidad óptica (no mas tarde de 10 minutos) usando un lector de microplaca con un filtro de 450nm.

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Para ser usado por operarios con un entrenamiento mínimo de laboratorio.

No use los componentes del kit que estén dañados ni contaminados.

Use una punta desechable independiente para cada muestra para evitar la contaminación cruzada.

La duplicación de todos los estándares y especímenes se recomienda aunque no es absolutamente indispensable.

Deben correrse al mismo tiempo los especímenes y los estándares para mantener las condiciones de prueba iguales.

Se recomienda no usar mas de 32 pozos en cada análisis si se usa un pipeteo manual ya que el pipeteo de todos los estándares y especímenes debe completarse dentro de 3 minutos. Una placa completa de 96 pozos puede usarse si se usa un pipeteo automático.

Tape todos los reactivos inmediatamente después de usarse.

Evite el pipeteo repetido de los agentes almacenados ya que esto puede causar contaminación.

No mezcle los reactivos ni las tiras cubiertas de anticuerpo tomadas de diferentes kits. Al eliminarse, hay que tener mucho cuidado de no tocar la superficie del pozo.

No permita que el reactivo se escurra a los lados del pozo. Antes de empezar el análisis permita ue todos los reactivos lleguen a la temperatura ambiente que oscile entre los 20°C y los 25°C. Agite suavemente los reactivos ya sea invirtiéndolos con suavidad o por giro.

Una vez que el análisis se iniciado, no se debe permitir que los pozos se sequen durante el análisis.

No contamine la solución de sustrato ya que esto inutilizaría todo el kit.

Revise la precisión y exactitud del equipo de laboratorio usado durante el procedimiento para asegurar resultados reproducibles.

Las tiras no usadas deben re introducirse en la bolsa resellable de hojilla de aluminio con desecante y sellarse usando la cremallera zip-lock y almacenarse a 2°C a 8°C.

EL CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Calcule el valor de la absorción media (A450) por cada juego de estándares y especímenes. Construya una curva estándar dibujando en un papel gráfico la absorción media de cada estándar contra su concentración en U/ml. Use los valores de absorción media de cada espécimen para determinar la correspondiente concentración del LH en mIU/ml de la curva estándar. Si los niveles de control o de las muestras conocidas de los usuarios do arrojan los resultados esperados, los resultados de las pruebas deben considerarse no válidos. Si usa el paquete de software, escoja una curva de regresión cuadrática.

VALORES ESPERADOS Y SENSIBILIDAD

La gráfica producida por los calibradores deberá tener forma hiperbólica con un OD450 de los calibradores proporcional a su concentración. El OD del calibrador A debe ser menor a 0.75 y el OD del calibrador F debe ser mayor a 1.5 para que los resultados del análisis sean válidos.

Cada laboratorio deberá establecer sus propios rangos normales basados en la población de pacientes. Los resultados proporcionados mas abajo, están basados en muestras clínicas de laboratorio de pacientes externos elegidos al azar.

	Edad	No. de Pacientes	LH(mIU/ml)	
			Medio	Rango
Hombres	<10	25	1.3	<2.5
Hombres	15-60	56	4.8	1.0 to 15.0
Mujeres	<10	25	1.1	<2.0
Mujeres	20-35	60	15.0	1.0 to 90.0
Mujeres	46-60	40	38.0	8.0 to 120.0

La concentración mínima detectable de la hormona Luteinizante por el PATHOZYME LH se estima ser de 1mIU/ml.

Se han observado concentraciones de 4000 mIU/ml al usar el PATHOZYME LH sin efecto prozono (de gancho).

DATOS EVALUATIVOS

Calibrados con los competidores mas importantes y con los estándares de la casa. El coeficiente de variación del PATHOZYME LH es menor o igual a un 10%.

Efectuada una evaluación entre el kit Pathozyme LH de Omega y el Kit Nichols Allegro LH IRMA para muestras con niveles entre 0.2 y 55.8 ng/ml, se genera la siguiente información

Número de muestras	113
Coefficiente de correlación	0.958
Pendiente	1.115
Intercepción	0.49
Medio del Omega	10.1 mIU/ml
Medio del Nichols Allegro	8.6 mIU/ml

Estos mostraron arrojar una buena correlación.

REFERENCIAS

- 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.

REFERENCIA RÁPIDA DEL PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

- Distribuya 50 de estándares y de suero de prueba y 100 µl del conjugado Anti-LH a cada pozo y mezcle totalmente durante 30 segundos.
- Incube por 45' minutos a temperatura ambiente (20°C to 25°C).
- Elimine el contenido de los pozos y lave 5 veces con agua destilada.
- Añada 100 µl de solución de sustrato a cada pozo y agite suavemente por 5 segundos.
- Incube en la oscuridad por 20 minutos a temperatura ambiente (20°C a 25°C).
- Añada 100 µl de solución de paro a cada pozo y agite suavemente por 30 segundos.
- Lea las densidades ópticas de forma inmediata (no mas allá de 10 minutos) usando un lector de micro placa con un filtro de 450nm.

8085 ISSUE 4 Revised August 2004 **SPANISH**
© 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