

Reactivo para la Determinación de la Hormona Luteinizante**Solo para diagnóstico In Vitro****Para uso exclusivo en laboratorios clínico o de gabinete
Conservar entre 2°C a 8°C****USO DESTINADO**

Inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de la hormona luteinizante en suero humano.

INTRODUCCIÓN

La hormona Luteinizante (LH) es producida en mujeres y hombres desde la glándula pituitaria anterior en respuesta a la hormona liberante de la hormona Luteinizante (LH-RH ó Gn-RH), la cual es liberada por el hipotálamo. La LH, también llamada hormona estimulante celular intersticial (ICSH) en hombres, es una glicoproteína con un peso molecular de aproximadamente 30,000 daltons. Ésta compuesta de dos cadenas de aminoácidos desiguales no covalentemente asociados, alfa y beta. La cadena alfa es similar a la encontrada en la hormona estimulante de la tiroides humana (TSH), a la hormona estimulante del folículo (FSH), y a la gonadotropina coriónica humana (hCG). Las diferencias entre estas hormonas se encuentra en la composición de aminoácidos de sus subunidades beta, las cuales explican su diferenciación inmunológica.

La secreción basal de LH en hombres es episódica y tiene la función primaria de estimular las células intersticiales (células Leydig) para producir testosterona. La variación en concentraciones de LH en mujeres está sujeta al complejo ciclo ovulatorio de mujeres saludables menstruantes, y depende de una secuencia de eventos hormonales a lo largo del eje gonado-pituitario-hipotalámico. La disminución en los niveles de progesterona y estradiol de la ovulación anterior da inicio a cada ciclo menstrual. Como resultado del decremento en los niveles hormonales, el hipotálamo incrementa la secreción de factores liberantes de gonadotropina (GnRF), los cuales a su vez estimulan la pituitaria para aumentar la producción y secreción de FSH. La elevación de los niveles de FSH estimula varios folículos durante la fase folicular, uno de estos madurará para contener el huevo. Conforme el folículo se desarrolla, el estradiol es secretado lentamente al principio, pero para el día 12 o 13 de un ciclo normal incrementa rápidamente. La LH es liberada como resultado de esta rápida elevación de estradiol debido a su estimulación directa de la pituitaria y aumento de los niveles de GnRF y FSH. Estos eventos constituyen la fase pre-ovulatoria.

La ovulación ocurre aproximadamente de 12 a 18 horas después de que LH alcanza un nivel máximo. Después de que el huevo es liberado, el cuerpo lúteo es formado el cual secreta progesterona y estrógeno retroalimentando los reguladores de LH.

La fase lútea rápidamente sigue esta fase ovulatoria, y está caracterizada por altos niveles de progesterona, por un segundo incremento de estradiol, y por bajos niveles de LH y FSH. Bajos niveles de LH y FSH son el resultado de efectos negativos de retroalimentación de estradiol y progesterona en el eje pituitario-hipotalámico.

Después de la concepción, el embrión desarrollante produce hCG, lo cual causa que el cuerpo lúteo continúe produciendo progesterona y estradiol. El cuerpo lúteo retrocede si el embarazo no ocurre, y la caída correspon-

diente en niveles de progesterona y estradiol causando la menstruación. El hipotálamo inicia un ciclo menstrual de nuevo como resultado de estos bajos niveles hormonales.

Los pacientes que sufren de hipogonadismo muestran incremento en las concentraciones de LH en el suero. Un decremento en la producción de hormona esteroide en mujeres es un resultado de ovarios inmaduros, falla ovárica primaria, enfermedad ovárica poliquística, o menopausia; en estos casos, la secreción de LH no está regulada. Una pérdida similar de hormonas reguladoras ocurre en hombres cuando las pruebas se desarrollan anormalmente o existe anorquia. Altas concentraciones de LH podrían también ser encontradas en fallas testiculares primarias y en el síndrome de Klinefelter, aunque los niveles de LH no serán necesariamente elevados si la secreción de andrógenos continúa. Las concentraciones incrementadas de LH también están presentes durante fallas renales, cirrosis, hipertiroidismo, y hambre severa.

Una falta de secreción por la pituitaria anterior podría causar bajos niveles de LH. Como podría ser esperado, los bajos niveles podrían causar infertilidad tanto en hombres como en mujeres. Los bajos niveles de LH podrían ser también debidos a la secreción disminuida de GnRH por el hipotálamo, aunque el mismo efecto podría ser visto por un fallo de la pituitaria anterior a la respuesta a la estimulación de GnRH. Los valores bajos de LH podrían por lo tanto indicar algún mal funcionamiento de la pituitaria o el hipotálamo, pero la fuente real del problema debe ser confirmado por medio de otras pruebas.

En el diagnóstico diferencial de la disfunción de la pituitaria, hipotalámico, o gonadal, las pruebas de la concentración de LH son rutinariamente realizados en conjunto con análisis de FSH ya que sus funciones están estrechamente interrelacionadas. Además, los niveles hormonales son utilizados para determinar la menopausia, ovulación exacta, y monitorear la terapia endocrina.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba cuantitativa de LH está basada en un ensayo inmunoabsorbente vinculado a las enzimas de fase sólida (ELISA). El ensayo utiliza un anticuerpo anti-ratón- α LH para la inmovilización de la fase sólida (micropozos) y un anticuerpo anti- β -LH monoclonal de ratón en la solución de conjugado (peroxidasa de rábano picante) del anticuerpo-enzima. La muestra de prueba es permitida reaccionar simultáneamente con los anticuerpos, causando que las moléculas de LH se encuentren entre la fase sólida y los anticuerpos vinculados a las enzimas. Después de una incubación de 45 minutos a temperatura ambiente, los pozos son lavados con agua para remover los anticuerpos etiquetados no adheridos. Una solución de TMB es agregada e incubada por 20 minutos, provocando el desarrollo de un color azul. El desarrollo del color es frenado con la adición de Solución de paro, y el color es cambiado a amarillo y medido espectrofotométricamente a 450 nm. La concentración de LH es directamente proporcional a la intensidad del color de la muestra de prueba.

REACTIVOS**Materiales abastecidos con el equipo de prueba**

1. Placa de micropozos recubiertos con anticuerpo monoclonal de ratón anti- α LH con 96 pozos
2. Reactivo de enzima conjugada. 1 frasco



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

Distribuido por:

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.
Rudyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria
CP 45110 Zapopan, Jalisco, México
Lada sin costo: 01 800 440 0404 c/ 10 líneas
Tel: 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas

3. Juego de estándares de referencia a diferentes concentraciones
4. Reactivo de TMB. 1 frasco
5. Solución de paro (1N HCl). 1 frasco
6. Solución búfer de lavado concentrado
7. Instructivo de uso

Materiales requeridos pero no abastecidos

1. Pipetas de precisión 40 µL - 200 µL y 1.0 mL
2. Puntas para pipetas desechables.
3. Agua destilada o desionizada
4. Mezclador Vórtex o equivalente.
5. Papel absorbente o toalla de papel
6. Papel cuadrículado
7. Un lector de MicroElisa.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL ESPÉCIMEN

El suero debe ser preparado de un espécimen de sangre entera obtenida por medio de técnicas médicas aceptables. Este equipo de prueba es para uso solamente con muestras de suero sin aditivos.

ALMACENAMIENTO DE LA PRUEBA E INSTRUMENTACIÓN

Los equipos de prueba sin abrir deben ser almacenados de 2 - 8 °C al ser recibidos y la placa de microtira debe ser guardada en una bolsa sellada con desecantes para minimizar la exposición al aire húmedo. Los equipos de prueba abiertos permanecerán estables hasta su fecha de caducidad, siempre y cuando sean almacenados como se describió anteriormente. Un lector de placa de microtira con una amplitud de banda de 10 nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 D.O. o mayor a una longitud de onda de 450 nm es aceptable para su uso en la medición de absorbancia.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Todos los reactivos deben ser traídos a la temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.
2. Reconstituya cada estándar liofilizado con 0.5 mL de agua destilada. Permita que el material reconstituido repose por al menos 20 minutos y mezcle cuidadosamente. Los estándares reconstituidos serán estables por 30 días siempre y cuando sean almacenados de 2 - 8°C.
3. Diluir un volumen de solución búfer de lavado concentrado (50x) en 49 volúmenes de agua destilada. Por ejemplo, diluir 15 mL de solución búfer de lavado concentrado (50x) en agua destilada para preparar 750 mL de búfer de lavado (1x). Mezclar bien antes de su uso.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Asegure el número deseado de pozos cubiertos en el soporte.
2. Dispense 50 µL de estándar, muestras, y controles en los pozos apropiados.
3. Dispense 100 µL de Reactivo de enzima conjugada en cada pozo.
4. Mezcle cuidadosamente por 30 segundos. Es muy importante tener un mezclado completo en este paso.
5. Incube a temperatura ambiente (18 - 25 °C) por 60 minutos.
6. Retire la mezcla de incubación dando pequeños golpes a los contenidos de la placa en el fregadero.
7. Enjuague y de pequeños golpes a los pozos de microtira 5 veces con búfer de lavado (1x).
8. Golpetee los pozos sobre el papel absorbente o toallas de papel para remover todas las gotas de agua residuales.
9. Dispense 100 µL de Reactivo TMB en cada pozo. Mezcle suavemente por 5 segundos.
10. Incube a temperatura ambiente en la oscuridad por 20 minutos.
11. Detenga la reacción al agregar 100 µL de solución de paro a cada

pozo.

12. Mezclar cuidadosamente por 30 segundos. **Es importante asegurarse que todo el color azul cambie a color amarillo totalmente.**
13. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de Micro-Elisa **dentro de un plazo no mayor a 15 minutos.**

NOTA IMPORTANTE

EL procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente resulta en una pobre precisión y absorbancias falsamente elevadas.

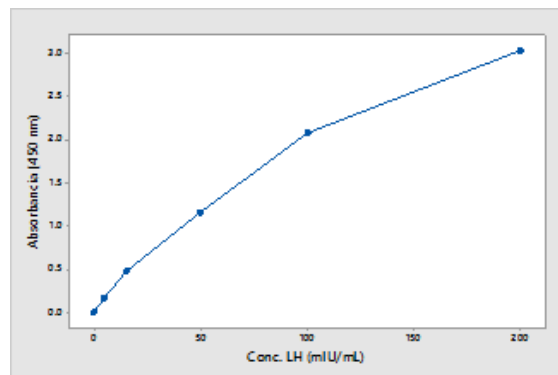
CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Calcule el valor de absorbancia media (A_{450}) para cada juego de estándares de referencia, especímenes, controles, y muestras de pacientes. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida de cada estándar de referencia comparada con su concentración en mIU/mL sobre el papel cuadrícula, con los valores de absorbancia sobre el eje vertical (Y) y las concentraciones sobre el eje horizontal (X). Utilizando el valor de absorbancia media para cada muestra, determine la concentración correspondiente de LH en mIU/mL desde la curva estándar.

EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR

Los resultados de una corrida estándar típica con lecturas de densidad óptica a 450nm mostradas en el eje Y contra las concentraciones de LH mostradas en el eje X. Esta curva estándar es con el propósito de ilustrar solamente, y no debe ser utilizada para hacer cálculos desconocidos. Cada usuario debe obtener sus propios datos y curva estándar en cada experimento.

LH (mIU/mL)	Absorbancia (450nm)
0	0.000
5	0.169
20	0.552
50	1.150
100	2.079
200	3.027



VALORES ESPERADOS

Cada laboratorio debe establecer sus propios rangos normales basados en la población de pacientes. Diferencias en la técnica de ensayo y la aplicación de normas distintas pueden afectar los resultados.

Adulto masculino	0 ~ 25 mIU/mL
Femenino fase folicular	0 ~ 40 mIU/mL
Ciclo medio	40 ~ 150 mIU/mL
Lútea	0 ~ 30 mIU/mL

Postmenopausia	20 ~ 200 mIU/mL
Femenina, prepuberal	0 ~ 9 mIU/mL
Masculino, prepuberal	0 ~ 17 mIU/mL

Se estima que la concentración mínima detectable de la hormona luteinizante humana por este ensayo es de 2 mIU/mL

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Existen algunas limitaciones del ensayo. Debemos dejar saber a sus clientes sobre esto.

1. Al igual que con todas las pruebas de diagnóstico, un diagnóstico clínico definitivo no debe basarse en los resultados de una sola prueba, sólo debe ser realizada por el médico después de que los hallazgos clínicos y de laboratorio han sido evaluados.
2. Los estudios han implicado a posibles interferencias en los resultados de inmunoensayo en algunos pacientes que presentan factor reumatoide y anticuerpos antinucleares. Las muestras de suero de pacientes que han recibido infusiones que contienen anticuerpos monoclonales de ratón para fines de diagnóstico o terapéuticos, pueden contener anticuerpos frente a la proteína de ratón (HAMA). Aunque hemos añadido algunos agentes para evitar las interferencias, no se puede garantizar la eliminación de todos los efectos de esta.
3. El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente causará una deficiente precisión y lecturas de absorbancia falsamente elevadas. El uso de agua del grifo para el lavado podría resultar en una mayor absorbancia 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. 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 Engvall, E. J. Immunol. Methods. 42: 11-15; 1981*

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

FABRICADO POR:
INTERNATIONAL IMMUNO-DIAGNOSTICS
1155 CHESS DRIVE No. 121
FOSTER CITY, CA 94404 USA