

Inserto Hormona Luteinizante (LH) ELISA

MONOBIND, INC.
Código de Producto: 625-300

Intención de uso:

La determinación cuantitativa de la concentración de la Hormona Luteinizante en suero humano o plasma por un micro plato de análisis Inmunoenzimométrico.

RESUMEN Y EXPLICACION DE LA PRUEBA.

La hormona luteinizante (LH), es una glico-proteína consistente de 2 sub-unidades con una masa molecular de 30,000 daltons. La α -sub unidad es similar a otras hormonas pituitarias. [La hormona estimulante del folículo (FSH), hormona tiroidea estimulante (TSH) y gonadotropina coriónica (CG)] mientras la β -sub unidad es única. La β -sub unidad confiere la actividad biológica a la molécula. La α -sub unidad consiste en 89 residuos de amino ácidos mientras la β -sub unidad contiene 129 aminoácidos. El carbohidrato contenido esta entre el 15% y el 30% . La utilización de la medición clínica de la Hormona Luteinizante (LH) en comprobación de la homeostasis de la regulación de fertilidad vía el hipotálamo – pituitaria – el eje gonadal ha sido bien establecida. (1,2). En adición, ahora con la tecnología de fertilización in Vitro (IVF) ha superado problemas asociados a la infertilidad ha provisto de impetu para la rápida mejora en la metodología de ensayo en LH desde la demanda técnica de bioanálisis (3) a un procedimiento de análisis Inmunoenzimométrico simple y rápido.

En este método, el calibrador LH, el espécimen del paciente o el control se agrega a un pozo cubierto de streptavidin. El Biotin monoclonal y los anticuerpos etiquetados de la enzima (dirigidos contra epitopes distintos y diversos de LH) se agregan y se mezclan. La reacción entre los varios anticuerpos de LH nativo forma un complejo de sándwich que se enlaza con el streptavidin cubierto al pozo. Después de la terminación del período requerido de la incubación, el anticuerpo de la hormona enzima-luteinizante conjugada encuadrada es separada de la conjugación desatada de la hormona enzima-luteinizante por la aspiración o la decantación. La actividad de la enzima presente en la superficie del pozo es cuantificada por la reacción con un sustrato conveniente para producir color. El empleo de varias referencias de suero con niveles conocidos de la hormona luteinizante permite la construcción de un gráfico de la actividad y de la concentración. De la comparación de la curva de la reacción a cierta dosis, la actividad de un espécimen desconocido se puede correlacionar con la concentración de la hormona luteinizante.

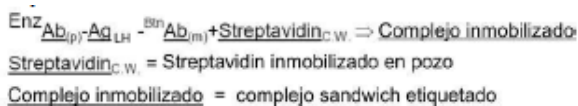
PRINCIPIO

Análisis Inmunoenzimométrico (Tipo 3):

Los reactivos esenciales requeridos por un análisis Inmunoenzimométrico incluyen alta afinidad y anticuerpos específicos (enzima e inmovilizado), diferentes y con reconocimiento distinto del epítopo, en exceso, y antígeno nativo. En este procedimiento, la inmovilización toma lugar durante el análisis en la superficie del micro pozo a través de la interacción de streptavidin recubierto en el pozo y el exógeno agregado biotinilado monoclonal al anticuerpo de anti-LH. Mezclando el anticuerpo inmovilizado, conjugación del enzima-antígeno etiquetado y un suero que contienen el antígeno nativo, una reacción de la competición resulta entre el antígeno nativo y los anticuerpos sin competencia o steric hindrance, para formar un sándwich complejo soluble. La interacción es ilustrada por la siguiente ecuación:



Simultáneamente, el complejo es depositado en el pozo a través de la reacción de alta afinidad de streptavidin y el anticuerpo biotinilado. Esta interacción esta ilustrada abajo:



Después de que se obtiene el equilibrio, la fracción del anticuerpo-unido es separado del antígeno desatado por la decantación o la aspiración. La actividad enzimática en la fracción del anticuerpo-límite es directamente proporcional a la concentración nativa del antígeno. Utilizando de varias referencias del suero de los valores sabidos del antígeno, una curva de la reacción a cierta dosis puede ser generada de la cual la concentración del antígeno de un desconocido puede ser comprobada.

REACTIVOS

MATERIAL PROVEEIDO

A. LH Calibradores -1ml/vial - Frascos A-F
Seis (6) frascos de referencia del suero para el antígeno LH en los niveles de 0(A), 5(B), 25(C), 50(D), 100(E) y 200(F) mIU/ml*. Almacene a 2-8°C. Se ha agregado un preservativo.

*Nota: los calibradores, basados en suero humano, se calibraron usando una preparación de referencia, el cual fue ensayado contra el WHO IRP (68/40).

B. REACTIVO DE ENZIMA PROLACTINA - 13ml/- frasco del iconoun (1) frasco etiquetado con enzima anticuerpo, biotinilado monoclonal Mouse IgG en solución, tinte y preservativo. Almacene a 2-8°C.

C. MICROPLATO REVESTIDO STREPTAVIDIN - 96 pozos - icono ?
Un (1) microplato de 96 pozos cubierto con streptavidin y empaquetado en una bolsa de aluminio con un agente deshidratado. Almacénesse a 2-8°C.

D. SOLUCION CONCENTRADA LAVADORA--20ml - icono
Un (1) frasco que contiene un surfactante en solución salina. Un preservativo ha sido agregado. Almacénesse a 2-8 °C.

E. SUBSTRATO A -- 7ml/frasco icono S
Un (1) frasco que contiene tetramethylbenzidine (TMB) en solución. Almacén en 2-8°C.

F. SUBSTRATO B --7ml/frasco icono S
Un (1) frasco que contiene el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en solución. Almacénesse en 2-8°C.

G. SOLUCIÓN DE PARO --8ml/frasco icono
Un (1) frasco que contiene ácido fuerte (1N HCl). Almacénesse en 2-8°C.
I. Instrucciones del producto.

Nota 1: No utilice los reactivos más allá de la fecha de vencimiento del kit. Nota 2: Los reactivos abiertos son estables por sesenta (60) días cuando están almacenados en 2-8°C.

Nota 3: Los reactivos son para una sola microplaca de 96-pozos.

MATERIAL REQUERIDO PERO NO PROPORCIONADO:

- Mida con una pipeta capaz de entregar los volúmenes 50µl con una precisión de mejor de 1.5%.
- Dispensadores para las entregas repetidas de los volúmenes 0.100ml y 0.300ml con una precisión de mejor de 1.5%.
- Lavador de Microplacas o una botella de apretón (opcional).
- Lector de Microplaca con filtros de 450nm & 620nm.
- Papel absorbente para retirar los excesos de los pozos de la microplaca.
- Plástico envolvente o tapa para la microplaca para los pasos de la incubación.
- Aspirador de vacío (opcional) para los pasos de lavado.
- Contador de tiempo.
- Materiales del control de calidad

PRECAUCIONES

Para el Uso De Diagnóstico In Vitro No Para el Uso Interno o Externo en Seres Humanos o Animales

Todos los productos que contienen el suero humano han sido encontrados para ser no-reactivos para el antígeno superficial de la hepatitis B, los anticuerpos del VIH 1&2 y de HCV por los reactivos con licencia del FDA. Puesto que ninguna prueba sabida puede ofrecer termine el aseguramiento que los agentes infecciosos están ausentes, todos los productos humanos del suero deben ser dirigidos como potencialmente peligrosos y capaces de transmitir enfermedad. Los buenos procedimientos del laboratorio para manejar productos de la sangre se pueden encontrar en el Centro para el Control de Enfermedad/el Instituto Nacional de la Salud, "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos," 2da Edición, 1988, publicación No. (CDC) 88-8395 de HHS.

RECOLECCION DE LA MUESTRA Y PREPARACION

Los especímenes deben ser sangre, suero en tipo y tener las precauciones generales en la colección de muestras del veni-puntura. Para la comparación exacta a los valores normales establecidos, una muestra de ayuno del suero de la mañana debe ser obtenida. La sangre se debe recoger en un tubo liso de veni-puntura de tapón rojo sin añadidos o anticoagulantes. Permita que la sangre coagule. Centrifugue el espécimen para separar el suero de las células. Las muestras se pueden refrigerar en 2-8°C por un período máximo de cinco (5) días. Si el espécimen no se puede probar dentro de este tiempo, la muestra se puede almacenar en las temperaturas de -20°C por hasta 30 días. Evite congelar y deshelar. Cuando analice en duplicado, se requiere 0.100ml del espécimen.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

1. SOLUCION LAVADORA.

Diluir el contenido del concentrado lavador a 1000ml con agua destilada o desionizada en un contenedor adecuado. Almacénese a temperatura ambiente entre los 20-27°C. por no mas de 60 días .

2. SOLUCIÓN DE TRABAJO SUSTRATO.

Vierta el contenido del frasco etiquetado con Solución "A" en el frasco etiquetado con Solución "B". Coloque la tapa amarilla sobre el frasco claro para fácil identificación. Mezcle y guarde a 2-8°C. O para periodos mas largos de uso determinado, la cantidad de reactivo que necesite y prepare mezclando porciones iguales del Sustrato A y Sustrato B en un contenedor adecuado. Por ejemplo, agregue 1ml de A y 1ml de B por dos (2) tiras de ocho pozos (si se excede en la solución, deseche la porción sobrante).

Nota: No se use el sustrato de trabajo si este se ve azul.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Antes de proceder con el análisis, tenga todos los reactivos, referencias del suero y controles a la temperatura ambiente (20 - 27°C.).

1. Ajuste a formato los pozos de los micro placas para que cada referencia del suero, control y espécimen del paciente sean analizados en duplicado. Guarde los micropozos nuevamente dentro del bolso de aluminio, séllela y almacénela en 2-8°C.

2. Mida con una pipeta 0.050 ml (50µl) de la referencia, del control o del espécimen apropiado del suero en el pozo asignado.

3. Agregue 0.100 ml (100µl) de la solución del reactivo de la enzima LH.

4. Remolinar el micro placa suavemente por 20-30 segundos para mezclar y cubrir.

5. Incube 60 minutos en la temperatura ambiente.

6. Deseche el contenido del micro placa por decantación o la aspiración. Si decanta, golpee ligeramente y borre la placa seca con el papel absorbente.

7. Agregue 300µl de la solución lavadora (véase la sección de la preparación del reactivo), decántelo (golpee y borre) o aspirelo. Repita dos (2) veces adicionales para un total de tres (3) lavadas. Una lavadora automática o manual de la placa puede ser utilizada. Siga las instrucciones del fabricante para el uso apropiado. Si se emplea una botella de apretón, llene cada uno bien presionando el envase (evite burbujas de aire) para dispensar la lavada. Decante la lavada y repita dos (2) veces adicionales.

8. Agregue 0.100 ml (100µl) de solución activadora del sustrato a todos los pozos (véase la sección de la preparación el reactivo). Agregue siempre re los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias de tiempo de reacción entre los pozos.

NO AGITE DESPUES DE ADICIONAL EL SUSTRATO

9. Incube en la temperatura ambiente por quince (15) minutos .

10. Agregue 0.050ml (50µl) de la solución de paro a cada pozo y mezcle suavemente por 15-20 segundos . Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias del tiempo de reacción entre pozos.

11. Lea la absorbencia en cada pozo en los 450nm (con una longitud de onda de referencia de 620-630nm para reducir al mínimo imperfecciones del pozo) en un lector del micro placa. Los resultados se deben leer en el plazo de treinta (30) minutos de agregar la solución de paro.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe tener controles de ensayo en bajo, medio y alto rango de la curva de la reacción para monitorear el buen funcionamiento del ensayo. Estos controles deben ser tratados como desconocidos y determinar los valores en cada método de prueba realizada. Las tablas de control de Calidad deben de mantenerse para seguir el funcionamiento de los reactivos proveídos. Los métodos estadísticos pertinentes deben ser empleados para comprobar las tendencias. Desviaciones significativas del funcionamiento establecido pueden indicar un cambio experimental en las condiciones o degradación del kit de reactivos. Reactivos frescos deben usarse para determinar la razón de las variaciones.

RESULTADOS

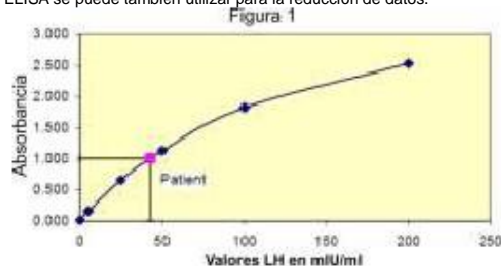
Una curva en la reacción se usa para comprobar la concentración de la hormona de folículo en especímenes desconocidos.

1. Registre la absorbencia obtenida del listado del lector del micro placas conforme al ejemplo 1.
2. Trace la absorbencia para cada referencia duplicada del suero contra la concentración correspondiente de LH en µIU/ml en el papel de gráfico lineal. (No promedie las referencias de los duplicados del suero antes de trazar)
3. Dibuje la mejor curva a través de los puntos trazados.
4. Para determinar la concentración del LH para un desconocido, localice la absorbencia promedio de los duplicados para cada desconocido en el eje del

gráfico, encuentre el punto que se interseca en la curva, y lea la concentración (en µIU/ml) del eje del gráfico (los duplicados del desconocido se pueden hacer un promedio según lo indicado). En el siguiente ejemplo, la absorbencia promedio (1.005) interseca la curva de respuesta a 42.7 mIU/ml de la concentración de LH (ver Ejemplo 1).

Muestra	I.D.	Pozo	Abs (A)	Signif. Abs (B)	Valor (µIU/ml)
Cal A		A1	0.009	0.009	0
		B1	0.009		
Cal B		C1	0.161	0.162	5
		D1	0.163		
Cal C		E1	0.677	0.662	25
		F1	0.647		
Cal D		G1	1.195	1.130	50
		H1	1.106		
Cal E		A2	1.852	1.825	100
		B2	1.797		
Cal F		C2	2.596	2.534	200
		D2	2.512		
Ctrl 1		E2	0.077	0.072	1.9
		F2	0.087		
Ctrl 2		G2	0.582	0.575	26.5
		H2	0.598		
Patient		A3	0.998	1.005	42.7
		B3	1.112		

Nota: El software de la reducción de datos de la computadora diseñado para los análisis de ELISA se puede también utilizar para la reducción de datos.



EJEMPLO 1

* Las informaciones presentadas en el Ejemplo 1 y figura 1 son ilustrativas solamente no deben usarse para basarse en la curva preparada con cada ensayo.

PARAMETROS DEL CONTROL DE CALIDAD

En orden para que los resultados del análisis sean considerados válidos los criterios siguientes deben ser conocidos:

1. La absorbencia (OD) del calibrador F debe ser ? 1.3.
2. Cuatro fuera de seis piscinas de control de calidad deben estar dentro de los rangos establecidos.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

A. Funcionamiento

1. Es importante que el tiempo de la reacción en cada uno pozos este llevada a cabo constante para que los resultados se produzcan. El medir con una pipeta de muestras no debe extender más allá de diez (10) minutos para evitar la deriva del análisis.
2. Si se utiliza más de una (1) placa, se recomienda repetir la curva de la reacción a cierta dosis.
3. La adición de la solución del sustrato inicia una reacción cinética, que es terminada por la adición de la solución de stop. Por lo tanto, la adición del sustrato y de la solución de paro se agrega en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
4. Los lectores de la placa miden verticalmente. No toque el fondo de los pozos.
5. El no retirar la solución adecuadamente en el paso del lavado y de la aspiración o de la decantación puede dar lugar a la réplica pobre y a resultados falsos.
6. Utilice los componentes del mismo lote. No entre mezclase los reactivos de diferentes lotes.

B. Interpretación

1. Si la reducción de datos controlados de la computadora se utilizan para interpretar los resultados de la prueba, es imperativo que los valores predichos para los calibradores varíen dentro del 10% de las concentraciones asignadas.
2. El LH es suprimido por el estrógeno pero en la mujer que toma contraceptivos orales el nivel puede ser bajo o normal. Las dietas excesivas y la pérdida de peso puede ser causa de concentraciones bajas de gonadotropina.
3. La concentración de LH es dependiente a diversos factores otros como la pituitaria homeostasis, la determinación solitaria no es suficiente para determinar un status clínico.

RANGOS ESPERA DOS Y VALORES

Un estudio de un normal adulto aparentemente normal fue tomado para determinar valores previstos para el sistema de pruebas por micro plato de LH por ELISA. Los valores previstos se presentan en la tabla 1.

TABLA 1
Valores Esperados para la prueba ELISA de LH
(EN Miu/ML. irp 68/40)

MUJER	
Fase Follicular	0.5 – 10.5
Midciclo	18.4 – 81.2
Fase Luteal	0.5 – 10.5
Postmenopausia	8.2 – 40.8
HOMBRE	
	0.7 – 7.4

Es importante tener presente que el establecimiento de una gama de los valores que se pueden esperar se encontró por un método dado para una población de personas "normal" es dependiente sobre una multiplicidad de factores: la especificidad del método, de la población probada y de la precisión del método en las manos del analista. Por estas razones cada laboratorio debe depender de la gama de valores esperados establecidos por el fabricante solamente hasta que una lata interna de la gama determinada por los analistas usando el método con una población indígena al área en la cual el laboratorio está situado.

CA RACTERISTICAS DE ACTUACIÓN

La precisión en y entre la precisión del análisis del procedimiento de LH ELISA Micro plac a fue determinada por análisis en tres diversos niveles de los sueros del control. El número (N), el valor medio(X), la desviación de estándar (?) y el coeficiente de variación (C.V.) para cada uno de estos sueros del control se presentan en la tabla 2 y la tabla 3.

TABLA 2
Precisión Dentro Ensayo (Valores en mIU/ml)

Muestra	N	X	σ	C.V.
Nivel 1	20	2.8	0.15	5.4%
Nivel 2	20	15.2	0.85	4.2%
Nivel 3	20	48.5	2.35	4.8%

TABLA 3
Precisión Entre Ensayo (Valores en mIU/ml)

Muestra	N	X	σ	C.V.
Nivel 1	10	3.1	0.17	5.5%
Nivel 2	10	15.4	0.81	5.3%
Nivel 3	10	47.9	2.86	6.0%

*Como medido en 10 experimentos por duplicado.

B. Exactitud

El procedimiento de FSH por micro plato de ELISA fue comparado con un método de referencia de radioinmunoanálisis. Especímenes biológicos de poblaciones normales y embarazos fueron analizados. El número total de estos especímenes fue de 110. La ecuación de regresión del último cuadro y la correlación del coeficiente fueron computadas por la ELISA LH en comparación con el método de referencia. La información obtenida se muestra en la tabla 4.

TABLA 4
Ultimo Cuadro

Método	Sign. (X)	Regresión Analisis	Correlación Coeficiente
Este método	14.8	$y=0.081+0.93(x)$	0.989
Referencia	15.1		

Solo una pequeña cantidad de la referencia de diagonal entre este método y el método de referencia es indicada por la proximidad de los valores medios. La ecuación de la regresión de la última tabla y el coeficiente de correlación indica un acuerdo excelente del método.

C. Sensibilidad

El procedimiento del LH tiene una sensibilidad de 0.04 μ IU. Esta es equivalente a una muestra que contiene una concentración de LH de 0.8 μ IU/ml.

D. Especificidad: El método de reactividad cruzada del LH para seleccionar sustancias fue evaluada agregando la sustancia que interfiere a una matriz del suero en las varias concentraciones. La reactividad cruzada fue calculada derivando un cociente entre la dosis de la sustancia que interfiere a la dosis de LH necesitada para desplazar el mismo trazo de la absorbancia.

Sustancia React Cruzada Concentración

Lutropina (LH) 1.0000----

B-LH subunidad < 0.00011000ng/ml

Folitropina (FSH) < 0.00011000ng/ml

Gonadotropina Corionica (hCG) < 0.00011000ng/ml

Tirotropina (TSH) < 0.00011000ng/ml

REFERENCIAS

1. Kosasa T.S., "Measurement of Human Luteinizing Hormone", *Journal of Reproductive Medicine*, 26, 201-6 (1981).
2. Danzer H, Braunstein GD, et al, "Maternal Serum Human Chorionic Gonadotropic Concentrations and Fetal Sex Predictions", *Fertility and Sterility*, 34, 336-40 (1980).
3. Braunstein GD, et al, "Serum Human Luteinizing Hormone Levels through Normal Pregnancy", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 126, 678-81 (1976).
4. Goldstein DP, and Kosasa T, "The Subunit Radioimmunoassay for LH Clinical Application", *Gynecology*, 6, 45-84 (1975).
5. Batzer F, "Hormonal Evaluation of Early Pregnancy", *Fertility and Sterility*, 34, 1-12 (1980).
6. 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).
7. Lenton E, Neal L and Sulaiman R, "Plasma Concentrations of Human Gonadotropin from the time of Implantation until the Second Week of Pregnancy", *Fertility and Sterility*, 37, 773-78 (1982).

