

### INTENCIÓN DE USO

Inmunoensayo para la detección cuantitativa de la concentración para la determinación de la hormona folículo estimulante FSH en suero humano.

### RESUMEN Y APLICACIÓN

FSH es una glicoproteína secretada por las células basofílicas de la pituitaria anterior. Como otras glicoproteínas tal como LH, TSH y HCG, la FSH consiste en sub-unidades designadas alfa y beta. Las hormonas de este tipo tienen una sub-unidad beta que son muy similares estructuralmente, por lo que las propiedades biológicas e inmunológicas van a depender de la única subunidad beta.

Los niveles de FSH se elevan antes de la menopausia, castración y en las fallas ováricas prematuras. Los niveles de FSH pueden normalizarse a través de la administración de estrógeno que demuestra un mecanismo inverso.

Existen relaciones "anormales" entre FSH y LH; y entre FSH y estrógeno se ha asociado la anorexia nerviosa la enfermedad ovárica poliquística. A pesar de que pueden darse excepciones significativas, se dan fallas ováricas cuando hay concentraciones aleatorias de FSH excediendo 40 mIU/ml.

Por razones no entendidas plenamente, hombres oligospermicos y azoospermicos usualmente tienen niveles elevados de FSH. En caso de tumores se deprime la presencia de FSH. Altos niveles de FSH en hombres pueden encontrarse en fallas testiculares primarias o en el Síndrome de Klinefelter. Concentraciones elevadas pueden también presentarse en fallas renales, hipertiroidismo y cirrosis hepática.

### DESCRIPCIÓN

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

MATERIALES PROVISTOS	96 pruebas
1. Placa de 96 pozos	1
2. Reactivo de enzima conjugada	12 ml
3. 6 calibradores 0, 5, 10, 25, 50, 100 mIU/ml liofilizado	0.5 ml
4. Reactivo solución TMB	12ml
5. Solución de Frenado (2N HCl)	12ml
6. Solución buffer concentrado 20X	25ml
7. Instructivo de uso	1

### 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.

### ADVERTENCIAS 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. 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 una temperatura de entre 2°C a 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.

### PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Todos los reactivos deberán ser traídos a la temperatura ambiente (18°-25°C) antes de su uso.
2. Preparar solución de lavado a 1x adicionando 475ml de agua destilada o desionizada al frasco de (25ml a 20x)

### 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.

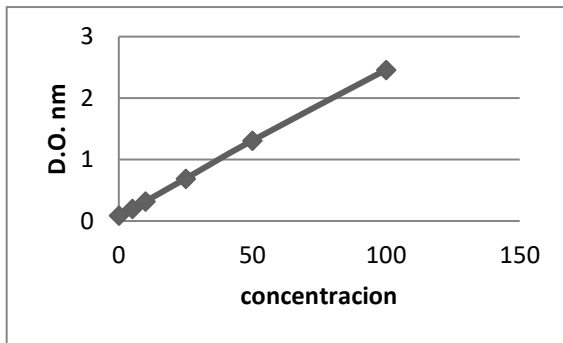
1. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los micropocillos no utilizados y refrigérelos a 2-8 °C.
2. Agregue 50 µl de estándares, especímenes y controles en los pozos apropiados.
3. Agregue 100 µl de reactivo de enzima conjugada.
4. Cubra e incuba a temperatura ambiente por 60 minutos (18-26°C).
5. Enjuague y lave los pocillos tres veces con 300 µl de solución de lavado de 1X. Golpee la placa de los micropocillos sobre el papel absorbente para remover las gotas de agua residuales.
6. Agregue 100 µl de sustrato TMB.
7. Incuba a temperatura ambiente por 15 minutos.
8. Frene la reacción agregando 50 µl de solución de frenado a cada pozo. Mezcle ligeramente por 30 segundos.
9. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de placa en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

## CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Calcule los valores de absorbancia media (A450) para cada juego de estándares de referencia, control y muestras del paciente.
2. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida para cada estándar de referencia comparada con su concentración en IU/ml sobre el papel cuadrícula, con los valores de absorbancia sobre el eje vertical (Y) y las concentraciones sobre el eje horizontal (X).
3. Utilice el valor de absorbancia media para cada muestra para determinar la concentración correspondiente de FSH en mIU/ml desde la curva estándar.

### Ejemplo de curva Standard

	Conc. mIU/mL	OD 450 nm
Std1	0	0.09
Std2	5	0.20
Std3	10	0.32
Std4	25	0.69
Std5	50	1.31
Std6	100	2.46



### 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 hCG pueden usar rangos utilizados solo como guía:

Clasificación	Rango Normal (mIU/ml)
Hombres	2.0-15
Mujeres	
Fase Lútea Folicular	2.0-10
Medio-ciclo	2.0-20
Embarazo	Menor que 2.0
Postmenopausia	Mayor que 15

### LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. 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.
2. 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 89 muestras de suero fueron analizadas utilizando el presente kit ELISA y otro kit de referencia. Fueron obtenidos los siguientes resultados:

Correlación	Pendiente	Intercepción
0.97	0.95	0.37

## 2. Precisión:

### Intra Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media mIU/ml	Desvío Estandar	Coefficiente de Variación (%)
1	16	9.6	0.6	6.3
2	16	21.8	1.22	5.6
3	16	49.6	3.3	6.7

### Inter Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media mIU/ml	Desvío Estandar	Coefficiente de Variación (%)
1	16	9.2	0.63	6.8
2	16	20.9	1.33	6.4
3	16	50.5	3.12	6.2

EL PUNTO DE LAVADO DE MICROPOZOS ES CRITICO YA QUE UN POBRE LAVADO DARÁ COMO RESULTADO IMPRECISIÓN O LECTURA ELEVADA FALSA DE LA PRUEBA

## 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	0.102	0.122	0.353

## 4. Recuperación:

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

Valor Esperado(mIU/ml)	Recupero (mIU/ml)	Porcentaje de recupero
49	54	110
89	87	98

## 5. Linealidad:

Suero	Valor Original (mIU/ml)	Porcentaje de Recupero		
		1:2	1:4	1:8
1	94.7	112	115	96
2	29	95	93	103

## REFERENCIAS

1. Qiu Q; Kuo A; Todd H; Dias JA; Gould JE; Overstreet JW; Lasley BL. Enzyme immunoassay method for total urinary follicle-stimulating hormone (FSH) beta subunit and its application for measurement of total urinary FSH. Fertil Steril 1998; 69(2):278-85.
2. Ulloa-Aguirre A; Timossi C. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. Hum Reprod Update 1998; 4(3): 260-83.
3. Desai MP; Khatkhatay MI; Sankolli GM; Joshi UM. Importance of selection of separation system in the development of enzyme immunoassay: an experience with follicle stimulating hormone (FSH) assay. J Immunoassay, 12(1):83-98 1991.
4. Nordin BE; Morris HA; Need AG; Horowitz M; Robertson WG. Relationship between plasma calcium fractions, other bone-related variables, and serum follicle-stimulating hormone levels in premenopausal, perimenopausal, and postmenopausal women. Am J Obstet Gynecol 1990; 163(1 Pt 1):140-5.
5. Rose MP. Follicle stimulating hormone international standards and reference preparations for the calibration of immunoassays and bioassays. Clin Chim Acta 1998; 273(2):103-17.
6. Popovic V; Micic D; Damjanovic S; Calovic L; Rolovic Z; Mijovic A; Petakov M; Manojlovic D; Micic J. Further evidence for differential regulation of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH): increased FSH and decreased LH levels in a patient with familial pure gonadal dysgenesis. Postgrad Med J 1992; 68(805):925-7.