

INTENCIÓN DE USO

Ensayo inmunoenzimático por quimioluminiscencia para la determinación cuantitativa de la hormona de estimulación folicular (FSH) en suero humano. Agente de diagnóstico in vitro, para uso exclusivo de laboratorio clínico o de gabinete.

RESUMEN Y APLICACIÓN

La FSH (hormona foliculo estimulante) es una hormona que se encuentra en humanos y otros animales. Es sintetizada y secretada por las células gonadotropas de la glándula pituitaria anterior. La prueba FSH evalúa la cantidad de esta hormona en muestra de sangre. La FSH es una glicoproteína secretada en respuesta a GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas), la cual es liberada por el hipotálamo. Las mismas células de la pituitaria secretan también la hormona LH (hormona Luteinizante). La FSH y LH están compuestas de una subunidad alfa y una beta. La subunidad específica beta es la que le confiere su actividad biológica única. La FSH y LH se unen a los receptores en los testículos y ovarios, donde regulan la función gonadal promoviendo la producción de esteroides sexuales y la gametogénesis. En mujeres, la FSH ayuda al control del ciclo menstrual y la producción de óvulos por los ovarios. La cantidad de FSH varía entre los ciclos menstruales de las mujeres y su concentración es alta justo antes de la ovulación. En hombres, la FSH ayuda al control de la producción de espermatozoides. La cantidad de FSH en hombres por lo general permanece constante. Se ha encontrado que la FSH humana recombinante puede causar varias mejoras, ya sea en aumentar espermatozoides en la eyaculación o incrementando el éxito en la inyección intracitoplásmica de espermatozoide en hombres infértiles con arresto en la maduración. En mujeres y hombres, la FSH y la LH son solicitadas como parte del tamizaje de infertilidad y desordenes gonadales o de la pituitaria. La FSH puede ser solicitada en mujeres que se les ha detenido el ciclo menstrual o se ha vuelto irregular, para determinar si la mujer está entrando a la menopausia. En mujeres, los niveles de FSH y LH pueden ayudar a diferenciar entre fallo ovárico primario (fallo de los ovarios por sí mismos) y fallo ovárico secundario (fallo en los ovarios debido a desordenes en la pituitaria o el hipotálamo). Los niveles incrementados de FSH y LH están ligados a fallo ovárico primario.

DESCRIPCIÓN

La prueba FSH CLIA es un inmunoensayo sólido de dos posiciones. Un anticuerpo monoclonal cubre la superficie de los pocillos y otros anticuerpos monoclonales etiquetado con peroxidasa equina la cual es usada como restauradora. Las moléculas de FSH presentes en el estándar o en el suero son emparejadas entre los anticuerpos. Siguiendo la formación del complejo anticuerpo recubierto antígeno-anticuerpo-enzima. Las etiquetas des adheridas anticuerpo-enzima son removidas mediante el lavado. La peroxidasa equina limitada en los pocillos es alcanzada por reacciones quimioluminiscencia. La unidad de luz relacionada (RLU) es proporcional a la concentración de FSH presente en la muestra.

CONTENIDO

Kit para la determinación de 96 pozos.

1. Placa con 96 pozos.
2. Enzima conjugada 2 vial con 6 ml.
3. 5 calibradores con 1 ml con concentraciones 1, 2.5, 10, 40, 160 mIU/ml.
4. Sustrato A 6.0 ml.
5. Sustrato B 6.0 ml.
6. Control 1 y 2 liofilizado.
7. PBS-T en polvo (buffer de lavado, 2 bolsas 5 g).
8. 1 bolsa zip-lock.
9. 2 piezas de papel autoadherible.
10. Instructivo de uso.

MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS

1. Pipetas de precisión.
2. Agua destilada.
3. Vórtex mezclador.
4. Papel absorbente o una toalla de papel.
5. Papel cuadrículado logarítmico.
6. Luminómetro.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. La sangre debe extraerse utilizando técnicas estándar de punción venosa y el suero debe separarse de las células rojas de la sangre tan pronto como sea posible. Evite muestras excesivamente hemolíticas, lipémicas o turbias.
2. Las muestras deben cerrarse y se pueden almacenar hasta 48 horas de 2-8°C, antes del ensayo. Para un periodo más largo de conservación se pueden congelar a -20°C. Las muestras descongeladas deben mezclarse antes de la prueba.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso de diagnóstico in vitro solamente.
2. El Manejo de reactivos y las muestras de suero deben estar de acuerdo con los procedimientos de seguridad local.
3. Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han probado y no reaccionan para el antígeno de superficie de hepatitis B, así como tampoco contra anticuerpos anti-VIH. Todos los productos de origen animal y sus derivados han sido recogidos de animales sanos. Los componentes bovinos son originarios de países en los que la EEB no se ha presentado, sin embargo, los estándares de referencia y componentes que contienen sustancias animales deben ser tratados como potencialmente infecciosos.
4. Evitar cualquier contacto con la piel.
5. No fumar, comer, beber o aplicar cosméticos en la zona de trabajo. No pipetear con la boca. Use ropa protectora y guantes desechables.

ALMACENAMIENTO DE EQUIPO E INSTRUMENTACIÓN

1. Almacene todos los componentes de 2 -8°C. No lo congele. Evitar la luz intensa.
2. Colocar los pocillos no utilizados en la bolsa zip-lock con desecante proporcionado y mantener de 2-8°C, condiciones en que los pozos se mantendrán estables durante 2 meses, o hasta la fecha de caducidad marcada, lo que ocurra primero.
3. Almacene los calibradores reconstituidos a 2-8°C, condiciones en que los reactivos se mantendrán estables 2 meses. Para usar por más tiempo, almacene en alícuotas y congelar a -20°C, evite múltiples ciclos de congelamiento-descongelamiento.
4. Selle y devuelva todos los reactivos no utilizados a 2-8°C, condiciones en que se mantendrá la estabilidad durante 2 meses, o hasta la fecha de caducidad marcada, lo que ocurra primero.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Mantener los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso durante al menos 30 minutos. Mezclar todos los reactivos por inversión suavemente o girando antes de su uso. No provocar la formación de espuma.
2. Ajustar la incubadora a 37 grados.
3. Para preparar Buffer de Lavado: añadir una bolsa de PBS-T en Polvo a 500 ml de agua destilada y mezclar. El buffer de lavado es estable a temperatura ambiente durante dos meses.
4. Determinar la cantidad de la solución de sustrato necesario y preparar mezclando volúmenes iguales de sustrato A y B en un recipiente limpio. Por ejemplo, añadir 1 mL de sustrato A y 1 mL de sustrato B para 2 tiras de ocho pocillos (quedará un ligero exceso de material preparado). Deseche la porción no utilizada si no se utiliza dentro de 20 minutos después de la mezcla.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Asegure el número deseado de micropozos en la placa. Dispense 25 µl de los estándares de FSH, las muestras y los controles en los micropozos.
2. Dispensar 100 µl de Enzima Conjugada en cada pocillo. Mezclar suavemente durante 30 segundos.
3. Cubrir la placa con la tapa adherente, incubar a 37°C durante 60 minutos.
4. Deseche el contenido de los pocillos vaciándolo en un recipiente de residuos. Enjuague los pocillos 5 veces con 350 µl de solución PBS de lavado. Golpee los pozos enérgicamente sobre papel absorbente para eliminar las gotas de agua residual.
5. Añadir 100 µl de la mezcla de sustratos A y B a cada pocillo y mezclar por 10 segundos.
6. Incubar a temperatura ambiente en la oscuridad 5 minutos sin agitar y leer los valores de RLU con un Luminómetro.

NOTAS IMPORTANTES

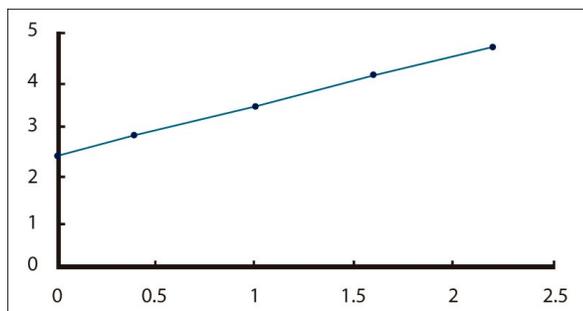
1. El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente producirá una mala precisión y valores elevados.
2. Se recomienda que no más de 32 pozos se utilicen para cada ensayo, si el pipeteo es manual, ya que el pipeteo de todos los estándares, muestras y controles deben ser completados dentro de 5 minutos. Una placa de 96 pozos puede ser utilizada si el pipeteo es automatizado.
3. La duplicación de todos los estándares y las muestras, aunque no es obligatorio, se recomienda.

CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Registre los RLU de cada pocillo. Calcule las medias de todas las muestras que estén por duplicado y utilice las medias para los cálculos.
2. Trace el logaritmo común del RLU para cada estándar de referencia contra el logaritmo común de las correspondientes concentraciones de FSH en mIU/mL en el papel gráfico logarítmico, con valores de RLU en el eje Y y concentración en el eje X.
3. Lea la concentración de cada control y la muestra por interpolación en la curva de calibración.
4. Si una computadora es utilizada, para determinar la concentración de FSH de una muestra, ingrese el logaritmo común del RLU de cada muestra y obtenga el logaritmo común de la concentración (en mIU/mL).

EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR

FSH (mIU/mL)	RLU's
1	247
2.5	600
10	2389
40	11571
160	47161



VALORES DE REFERENCIA

Cada laboratorio debe establecer su propio rango normal basado en la población de pacientes. Estos valores se dan sólo para orientación.

Rangos de referencia (mIU/mL)	
Hombres	1-12.1
Mujeres con menstruación normal	
Fase Folicular	2.5-11.4
Pico de medio ciclo	3.3-21.7
Fase Lútea	1.2-7
Mujeres Postmenopáusicas	18.8-132

PERFORMANCE

1. Sensibilidad analítica:

Definida como la concentración correspondiente a la media de los RLU's en 10 repeticiones del diluyente del calibrador más 2 desviaciones estándar, es de ≤ 0.5 mIU/mL.

2. Especificidad:

Este ensayo está diseñado para no tener reactividad cruzada con las sustancias enlistadas a continuación, con las concentraciones enlistadas, en buffer Tris-HCl con 50% de suero bovino y 3% de BSA (suero de albumina bovina).

INTERFERENCIAS	CONCENTRACIÓN
LH	500 mIU/mL
TSH	520 mIU/mL
HCG	22800 mIU/mL

3. Precisión:

La precisión Intra-ensayo se determinó analizando 2 sueros humanos con 20 repeticiones de cada uno. Los resultados se muestran abajo.

Suero	Lote	n	Media	SD	CV (%)
Titulación Baja	1	20	3.18	0.23	6.80
Titulación Alta	1	20	15.02	1.05	4.60

La precisión Inter-ensayo se determinó analizando dos sueros humanos con 2 duplicados, una vez por día durante 20 días. Los resultados se muestran a continuación.

Panel	n	Media	SD	CV (%)
1	120	3.14	0.35	11.24
2	120	14.61	1.50	10.25

4. Efecto gancho de alta dosis:

En este ensayo de FSH, las muestras de pacientes con niveles de FSH mayores que 580 mIU/mL dan valores más altos de RLU que el último punto de la calibración.

REFERENCIAS

1. Grover A, Sminth CE, Gregory M, et al. Effects of FSH receptor deletion on epididymal tubules and sperm morphology, numbers, and motility. Mol. Reprod. Dev. 2005; 72(2): 135-144.
2. McDonough PG. Molecular abnormalities of FSH and LH action. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2003; 997: 22-34.
3. Ferhi K, Avakian R, Griveau J-F, Guille F. Age as only predictive factor for successful sperm recovery in patients with Klinefelter's syndrome. Andrologia. 2009; 41(2): 84-87.
4. Efesoy O, Cayan S, Akbay E. The efficacy of recombinant human follicle-stimulating hormone in the treatment of various types of male-factor infertility at a single university hospital. J. Androl. 2009; 30(6): 679-684.