

Immunoensayo Enzimático para la Determinación Cuantitativa de la Hormona de Estimulación del Folículo (FSH) en Suero Humano

Solo para diagnóstico In Vitro
Para uso exclusivo en laboratorios clínicos o de gabinete
Conservar entre 2°C a 8°C

NOMBRES COMUNES Y DE PROPIEDAD

Immunoensayo de la Enzima de FSH

USO DESTINADO

Para la determinación cuantitativa de la hormona de estimulación del folículo en suero humano. Este ensayo es útil en el diagnóstico y tratamiento de trastornos pituitario y gonadales.

INTRODUCCIÓN

La Hormona de Folículo Estimulante (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH) están estrechamente involucradas en el control de las actividades de crecimiento y reproducibilidad de los tejidos gonadales, los cuales sintetizan y secretan las hormonas masculinas y femeninas. Los niveles de FSH y LH circulantes están controlados por estas hormonas sexuales a través de una relación de retroalimentación negativa.

FSH es una glicoproteína secretada por las células basofílicas de la pituitaria anterior. La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), producida en el hipotálamo, controla la liberación de FSH desde la pituitaria anterior. Así como con otras glicoproteínas, tales como LH, TSH, y hCG, FSH consiste de sub-unidades designadas como alfa y beta. Las hormonas de este tipo tienen sub-unidades alfa las cuales son estructuralmente muy similares; por lo tanto, las propiedades biológicas e inmunológicas son dependientes únicas de las sub-unidades beta.

En la mujer, FSH estimula el crecimiento y la maduración de los folículos ováricos al actuar directamente sobre los receptores localizados en las células granulosas; la esteroidogénesis folicular es promovida y la producción de LH es estimulada. La LH producida se une a las células de la teca y estimula la esteroidogénesis. La producción de estradiol intraovárica incrementada ocurre conforme la maduración folicular avanza, y por lo tanto estimula la actividad receptora de FSH incrementada y la unión folicular de FSH. FSH, LH, y estradiol están por lo tanto estrechamente relacionados para apoyar el reclutamiento ovárico y la maduración en la mujer.

Los niveles de FSH son elevados después de la menopausia, castración, y de una falla ovárica prematura. Los niveles de FSH podrían ser normalizados a través de la administración de estrógeno, el cual demuestra ser un mecanismo de retroalimentación negativa. Las relaciones anormales entre FSH y LH y entre FSH y estrógeno han sido vinculadas a la anorexia nerviosa y a la enfermedad ovárica policística. Aunque existen excepciones significativas, la falla ovárica es indicada cuando las concentraciones de FSH aleatorias exceden de 40 mIU/mL.

El crecimiento de conductos seminíferos y el mantenimiento de espermatogénesis en hombres es regulado por la FSH. Sin embargo los andrógenos, a diferencia del estrógeno, no disminuyen los niveles de FSH, por lo tanto demuestran una relación de retroalimentación solamente con LH sérico.

Por razones no totalmente comprendidas, los hombres azoospermicos y oligospermicos generalmente tienen niveles elevados de FSH. Los tumores de los testículos generalmente reducen las concentraciones de FSH en suero.

Los niveles altos de FSH en hombres podrían ser encontrados en la falla testicular primaria y en el síndrome de Klinefelter. Las concentraciones elevadas se encuentran también presentes en casos de inanición, falla renal, hipertiroidismo, y cirrosis.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba cuantitativa de FSH está basada en un ensayo inmunoabsorbente vinculado a la enzima de fase sólida (ELISA). El sistema de ensayo utiliza un anticuerpo anti- α -FSH monoclonal de ratón para la inmovilización de la fase sólida (pozos de microvaloración) y otro anticuerpo anti- β -FSH monoclonal de ratón en la solución de conjugado (peroxidasa de rábano picante) enzima- anticuerpo. La muestra de la prueba es permitida reaccionar simultáneamente con los dos anticuerpos, causando que las moléculas de FSH se encuentren entre la fase sólida y los anticuerpos enlazados a las enzimas. Después de una incubación de 45 minutos a temperatura ambiente, los pozos son lavados con agua para remover los anticuerpos sin adherir etiquetados. Una solución de TMB es agregada e incubada a temperatura ambiente por 20 minutos, provocando el desarrollo de un color azul. El desarrollo del color es frenado con la adición de 1N HCl, cambiando el color a amarillo. La concentración de FSH es directamente proporcional a la intensidad de color de la muestra de la prueba.

REACTIVOS

Materiales abastecidos con el equipo de prueba:

1. Placas de micropozos cubiertos de anticuerpo monoclonal de ratón anti- α -FSH con 96 pozos
2. Reactivo de Enzima Conjugada
3. Juego de estándares de referencia que contienen 0, 5, 20, 50, 100, y 200 mIU/mL
4. Reactivo TMB
5. Solución de Paro (1N HCl)
6. Solución búfer concentrada (50x)
7. Instructivo de uso

Materiales requeridos pero no abastecidos

1. Pipetas de precisión 40 - 200 μ L, 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. Un lector de MicroElisa.



"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

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 a 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 (de 18 a 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 búfer de lavado concentrado (50x) en 49 volúmenes de agua destilada. Por ejemplo, diluir 15 mL de búfer de lavado concentrado (50x) en agua destilada para preparar un volumen final de 750 mL de búfer de lavado (1x). Mezcle bien antes de su uso.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Asegure el número deseado de pozos en el soporte.
2. Agregue 50 µL de estándar, muestras y controles en los pozos apropiados.
3. Agregue 100 µL de Enzima Conjugada en cada pozo.
4. Mezcle por 30 segundos. Es muy importante tener una mezcla completa en este paso.
5. Incube a temperatura ambiente por 45 minutos (18 - 25 °C)
6. Remueva la mezcla incubada dando pequeños golpes y vierta el contenido de la placa en un contenedor para desechos.
7. Lave y de pequeños golpes la placa de microtira 5 veces con solución búfer de lavado (1x).
8. Sobre un papel o toalla absorbente remueva las gotas residuales.
9. Agregue 100 µL de Reactivo TMB en cada pozo y agite cuidadosamente por 10 segundos
10. Incube a temperatura ambiente en la oscuridad por 15 minutos
11. Detenga la reacción añadiendo 100 µL de Solución de Paro a cada pozo.
12. Agite cuidadosamente 30 segundos. **Es importante asegurarse que todo el color azul cambie a amarillo completamente.**
13. Lea a 450 nm la D.O. **en un plazo no mayor a 15 minutos.**

Nota importante: El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente puede afectar la precisión y elevar falsamente la absorbancia.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

1. Calcule el valor de absorbancia media (A_{450}) para cada juego de estándares de referencia, especímenes, controles, y muestras de pacientes.
2. 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

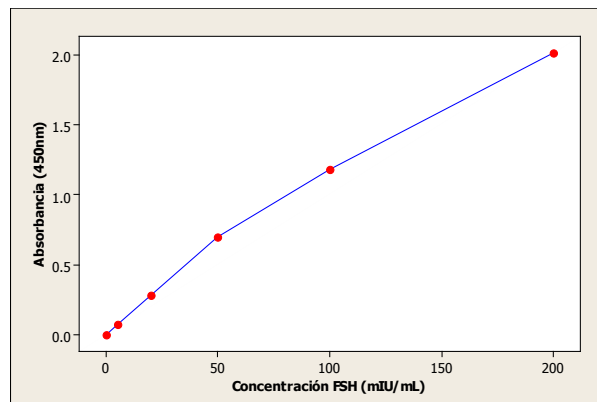
sobre el eje vertical (Y) y las concentraciones sobre el eje horizontal (X).

3. Utilizando el valor de absorbancia media para cada muestra, determine la concentración correspondiente de FSH en mIU/mL desde la curva estándar.
4. En las muestras diluidas el resultado debe ser corregido por el factor de dilución apropiado.

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 FSH 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.

FSH (mIU/mL)	Absorbancia (450 nm)
0	0.000
5	0.072
20	0.282
50	0.694
100	1.184
200	2.013



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.

Muestra	Rango (mIU/mL)
Masculino	0.0 - 20.0
Femeninas con menstruación normal	
Fase Folicular	0.0 - 20.0
Pico Ovulatorio	15.0 - 30.0
Fase Lútea	0.0 - 20.0
Femenina Post-menopáusica	40.0 - 200.0

SENSIBILIDAD

La concentración mínima detectable de la FSH humana medida por este ensayo es de 2.5 mIU/mL.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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.

REFERENCIAS

1. Marshall, J.C.: *Clinic. In Endocrinol. Metab.*; 4, 545 (1975)
2. Cohen, K.L.: *Metabolism*, 26, 1165 (1977)
3. Rebar, R.W., Erickson, G.G. and Yen, S.S.C.: *Fertil. Steril.* 37, 35 (1982)
4. Abraham, G.E., Ed.: *Radioassay Systems in Clinic. Endocrinol. Marcel Dekker, Inc., New York (1981)*
5. Uotila, M., Rouslahti, E. and Engvall, e., *J. Immunol. Methods*, 42, 11 (1981)

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

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