

**hFSH [I-125] IRMA kit**

RK-790CT. Estuche para 100 determinaciones

Ensayo inmunoradiométrico para la determinación cuantitativa *in vitro* de la hormona foliculo estimulante (hFSH, folitropina) en suero humano, en el rango de 0,17-150 mUI/mL.

**Introducción**

La hFSH es una glicoproteína de 33 kDa segregada por la hipófisis anterior. Al igual que otras hormonas glicoproteicas (hLH, hTSH, HCG) la hFSH está compuesta por dos subunidades:  $\alpha$  y  $\beta$ , unidas por enlaces no covalentes. La estructura de la subunidad  $\alpha$  es prácticamente igual para las cuatro hormonas mencionadas, mientras que las unidades  $\beta$  se diferencian y son responsables por la actividad biológica de cada molécula.

La producción de hFSH es estimulada por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que secreta el hipotálamo, mientras que los esteroides secretados por el ovario y el cuerpo lúteo ejercen una retroalimentación negativa sobre su producción.

En las mujeres la hFSH es la causante de la maduración y crecimiento de los folículos ováricos. En los hombres la hFSH estimula la producción de testosterona y la espermatogénesis.

La determinación de la hFSH en suero es esencial para la investigación de la fertilidad y particularmente de las disfunciones del eje hipotálamo – hipófisis – gónadas.

**Principio del ensayo**

Este ensayo utiliza el principio del análisis inmunoradiométrico (IRMA) en fase sólida. Para ello emplea dos anticuerpos monoclonales que reconocen dos epítopes diferentes de la molécula. Uno de ellos está marcado con radioyodo (anticuerpo “señal”) y el otro, no marcado, funciona como anticuerpo “captura”.

El inmunocomplejo formado por el antígeno con los dos anticuerpos (“sándwich”) se inmoviliza en la superficie de los tubos de ensayo durante un período de incubación de 1 hora bajo agitación constante. Después se decantan los tubos y se mide la radiactividad enlazada en un contador gamma. La radiactividad presente en los tubos es directamente proporcional a la concentración de la hormona presente en el sistema. Utilizando calibradores de concentración conocida de hFSH se prepara una curva de calibración a partir de la cual se determina por interpolación la concentración de hFSH presente en las muestras.

**Contenido del juego**

**1. TRAZADOR**, 1 frasco con 21 mL, listo para usar, contiene < 740 kBq de anticuerpo monoclonal anti-hFSH marcado con <sup>125</sup>I y anticuerpo monoclonal anti-hFSH biotinilado en solución tampón con 0,1 % NaN<sub>3</sub> y colorante rojo.

**2. CALIBRADORES (S1-S6)**, 6 frascos listos para usar con 1 mL de suero bovino con 0,1% NaN<sub>3</sub>. Los calibradores contienen aproximadamente: 0; 0,4; 2; 10; 40; 150 mUI/mL y han sido calibrados contra el estándar de referencia WHO 92/510. Las concentraciones exactas se indican en las etiquetas de los viales.

**3. SUERO CONTROL**, 1 frasco, contiene 1 mL de suero humano liofilizado con 0,1% NaN<sub>3</sub>. La concentración del suero control está especificada en el certificado de calidad incluido.

**4. TUBOS RECUBIERTOS**: 2x50 tubos de 12x75 mm, empaquetados en cajas plásticas, listos para usar.

**5. SOLUCIÓN DE LAVADO**, 1 frasco, contiene 20 mL de solución concentrada. Diluir con 700 mL de agua destilada. Contiene 0,2 % NaN<sub>3</sub>.

**Materiales y equipos necesarios**

Gradilla para tubos de ensayo, pipetas de precisión con puntas desechables (100, 200 y 2000  $\mu$ L), agitador horizontal u orbital, lámina de polietileno, papel absorbente, contador gamma

**Materiales y equipos recomendados:**

Pipeta de repetición (200 y 2000  $\mu$ L). Jeringa automática (dispensador) para el lavado.

**Recolección y almacenamiento de las muestras**

Las muestras de suero deben colectarse de acuerdo a los procedimientos habituales que se practican en los laboratorios clínicos. Las muestras pueden conservarse entre 2 y 8 °C si el análisis se efectuará dentro de las 24 horas siguientes a su recolección, de lo contrario deben conservarse congeladas a una temperatura igual o menor que -20 °C hasta 5 meses. Las muestras congeladas deben descongelarse y mezclarse completamente antes de su uso. Evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

**Preparación y conservación de los reactivos**

Conservar los reactivos entre 2 y 8 °C después de abiertos. A esta temperatura cada componente es estable hasta la fecha de vencimiento del juego. La fecha de caducidad exacta se especifica en la etiqueta del estuche y en el certificado de calidad.

La solución concentrada de lavado debe diluirse con 700 mL de agua destilada. Así diluida esta solución se conserva entre 2 y 8 °C hasta la fecha de vencimiento del juego.

El suero control se reconstituye con 1 mL de agua destilada. Para ello se debe mezclar suavemente evitando la formación de espuma. Permitir que la solución alcance la temperatura ambiente (20 a 30 °C) antes de su uso. Para usos posteriores, conservar congelado bajo -20 °C.

**PRECAUCIÓN!**

Permitir que todos los reactivos y muestras alcancen la temperatura ambiente. Homogenizar completamente todos los reactivos y muestras antes de su uso, evitando la formación de espuma.

**Procedimiento para el ensayo**

(Ver Tabla 1.)

- Rotular los tubos recubiertos por duplicado para los totales (T), calibradores (S1-S6), suero control (C) y muestras (M).
- Añadir por duplicado 100  $\mu$ L de calibrador, suero control y muestras en los tubos apropiados
- Añadir 200  $\mu$ L de trazador en cada tubo.
- Fijar la gradilla con los tubos de ensayo firmemente en el agitador horizontal. Cubrir los tubos con una lámina de polietileno. Encender el agitador y ajustar la velocidad de manera tal que el líquido en los tubos esté rotando o agitándose constantemente. Incubar los tubos a temperatura ambiente en el agitador durante 1 hora.
- Añadir 2 mL de solución de lavado a cada tubo. Aspirar o decantar el líquido de todos los tubos (excepto T) mediante la inversión de la gradilla. Colocar la gradilla sobre un papel absorbente por 2 minutos manteniendo la posición invertida.
- Repetir una vez más el procedimiento de lavado según el punto 5.
- Medir la radiactividad de cada tubo por 60 segundos en un contador gamma y calcular la concentración de hFSH en las muestras como se describe a continuación.

Tabla 1. Protocolo del ensayo (volúmenes en microlitros)

	T	S1-S6	C	M
Calibrador		100		
Control			100	
Muestra				100
Trazador	200	200	200	200
Agitar 1 hora a temperatura ambiente				
Solución de lavado		2000	2000	2000
Decantar y secar en papel absorbente				
Solución de lavado		2000	2000	2000
Decantar y secar en papel absorbente				
Medir la radiactividad (60 s/tubo)				
Procesar los datos				

## Cálculo de los resultados

En la Tabla 2 y la figura 1 se muestran a manera de ejemplo los cálculos y una curva estándar típica de un ensayo.

Para los cálculos:

Hallar la media de los conteos por minuto (cpm) para cada par de tubos. Restar de cada media el promedio de cpm obtenido para el calibrador de concentración cero (S1 = enlace no específico, NSB). Los valores así corregidos se dividen por la actividad total (T) como se muestra a continuación:

$$B/T (\%) = \frac{S2-6/Mx/(\text{cpm}) - S1(\text{cpm})}{T(\text{cpm})} \times 100$$

Construir una curva estándar ploteando las medias de cpm o, alternativamente, los valores B/T% contra la concentración de hFSH de cada calibrador en un papel log-log.

Determinar la concentración de hFSH en las muestras basándose en las respectivas medias de cpm o en los valores B/T%, por interpolación de la curva estándar. No extrapolar valores fuera del rango de la curva.

Para el procesamiento automatizado de los datos, recomendamos el uso del programa de ajuste tipo spline, desarrollado especialmente para el análisis inmunoradiométrico. Existen programas que interpolan los valores que se encuentran entre el calibrador de concentración cero y el primer calibrador. Entre las concentraciones así calculadas, solo aquellas mayores que el límite de detección del ensayo pueden considerarse como reales (ver sensibilidad).

Tabla 2. Resultados característicos del ensayo

Tubos	Media de conteos (cpm)	B/T%
T	308164	-
S1	59	0,02
S2	364	0,12
S3	1810	0,59
S4	8414	2,73
S5	34174	11,1
S6	107452	34,9
C	7652	2,48

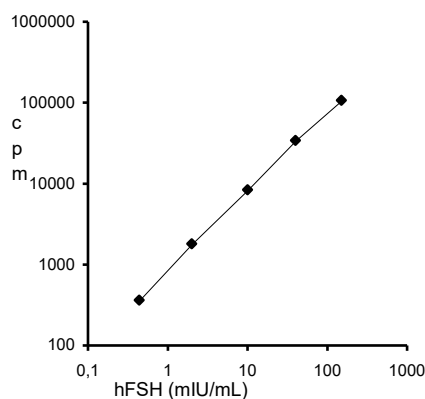


Figura 1.

Curva estándar típica (No utilizar para calcular concentraciones de las muestras!)

## Características del ensayo

### Sensibilidad

Los Límites del Blanco (LoB), de Detección (LoD) y de Cuantificación (LoQ) fueron determinados según el documento EP17-A2 del CLSI.

LoB: 0,07 mIU/mL

LoD: 0,17 mIU/mL

LoQ: 0,32 mIU/mL

### Especificidad

La reacción cruzada con hLH y hCG es de 0,12% y 0,0008%, respectivamente.

No se observa reacción cruzada detectable con las hormonas hTSH, hGH y hPRL en concentraciones superiores a las fisiológicas normales.

## Precisión

La precisión de un solo sitio se calculó utilizando cinco muestras a diferentes concentraciones de hFSH, de acuerdo con el documento EP05-A3 del CLSI. Las muestras se midieron en veinte días, con dos ensayos por día y utilizando dos réplicas por muestra.

Muestra	Media (mIU/ml)	Repetibilidad		Precisión intra-laboratorio	
		SD	CV%	SD	CV%
Pool 1	1,69	0,05	2,97	0,05	3,25
Pool 2	5,65	0,08	1,46	0,12	2,14
Pool 3	12,99	0,14	1,04	0,19	1,43
Pool 4	41,41	0,60	1,46	0,71	1,71
Pool 5	109,86	2,15	1,96	3,24	2,95

La precisión multi-sitio se calculó utilizando 5 muestras a diferentes concentraciones de hFSH, de acuerdo con el documento EP05-A3 del CLSI. Las muestras se midieron en tres sitios diferentes, en cada sitio se realizaron cinco corridas, una corrida por día y utilizando cinco réplicas por corrida.

Muestra	Media (mIU/mL)	Repetibilidad		Precisión intra-laboratorio		Reproducibilidad	
		SD	CV%	SD	CV%	SD	CV%
Pool 1	0,43	0,03	7,40	0,03	7,72	0,04	8,37
Pool 2	2,58	0,07	2,75	0,09	3,49	0,10	3,92
Pool 3	7,08	0,15	2,09	0,18	2,54	0,23	3,27
Pool 4	22,53	0,31	1,37	0,42	1,87	0,56	2,47
Pool 5	104,14	1,65	1,58	1,98	1,90	2,64	2,53

## Prueba de recuperación

La recuperación se determinó como la diferencia porcentual entre el incremento observado y el incremento esperado, luego de añadir concentraciones conocidas a 3 niveles de hFSH a 6 muestras de suero diferentes. La recuperación media obtenida fue de 97,3, en un rango entre 92,5% y 105,2%.

## Linealidad

La linealidad se evaluó de acuerdo con el documento EP06-A del CLSI, utilizando el método polinomial. El método resultó lineal desde 0,08 mUI/ml hasta 206,5 mUI/ml, con un margen de error del 10 % en este intervalo.

## Interferencias

Las pruebas de interferencia se realizaron de acuerdo con el documento EP07-A2 del CLSI. No se observa interferencia hasta las siguientes concentraciones:

Bilirrubina	262 µmol/l
Triglicéridos	32,1 mmol/l
Hemoglobina	4,7 g/l
Factor Reumatoide	400 IU/ml
Biotina	100 ng/ml
Acido acetilsalicílico	3,0 mg/dl
Acido ascórbico	5,25 mg/dl
Bromocriptina	10 mg/dl
Cabergolina	1 mg/dl
Clomifeno	20 mg/dl
Diclofenaco	2,4 mg/dl
Ibuprofeno	21,9 mg/dl
Letrozole	1 mg/dl
Metformina	156 mg/dl
Paracetamol	15,6 mg/dl

## Valores de referencia

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia. Los valores que se proporcionan a continuación deben considerarse solo como informativos.

Varones adultos: 1,0 - 10,5 mUI/mL

Mujeres adultas:

pico ovulatorio: 4,0 - 13,5 mUI/mL

pre- y post-ovulación: 0,6 - 9,5 mUI/mL

postmenopáusicas: 30 - 135 mUI/mL

## Limitaciones del procedimiento

- Los reactivos provistos en este juego están optimizados para la medición del hFSH en suero humano.
- Los resultados de este análisis deben ser utilizados conjuntamente a la información clínica pertinente.
- Las muestras hemolizadas, turbias o lipémicas pueden dar resultados falsos, evite su uso.
- No se observa efecto Hook con el uso del presente producto en concentraciones de hFSH hasta 9846 mUI/mL. Para cualquier muestra con una concentración mayor que 150 mUI/mL se obtendrán valores superiores a 150 mUI/mL. Estas muestras deben ser diluidas con el calibrador de concentración cero y reanalizadas.

## Notas acerca del procedimiento

1) **Fuente de error!** Los tubos recubiertos no están marcados individualmente. Se debe evitar la mezcla con tubos de ensayo comunes. Para minimizar este riesgo, no se deben sacar de la caja más tubos de los necesarios, de igual manera los tubos no utilizados en una serie deben ser guardados de nuevo en su caja. Se recomienda rotular los tubos con marcador permanente.

2) **Fuente de error!** Para asegurar la agitación eficiente de los tubos se debe utilizar una gradilla que los ajuste firmemente. Una agitación inadecuada puede provocar un rendimiento deficiente del ensayo y falsos resultados.

3) **Dosificación de la solución de lavado.** Para la adición de la solución de lavado se recomienda una jeringa automática o dispensador, equipado con un recipiente de 1 litro y un tubo flexible para la dosificación. En su ausencia puede utilizarse una pipeta automática apropiada.

**¡Atención!** ¡No mezclar los componentes de lotes diferentes o con productos de otro fabricante!

## Precauciones

### Material radiactivo

Este producto contiene material radiactivo. Es responsabilidad de cada laboratorio cumplir con las regulaciones locales referentes a la manipulación, conservación y desecho de materiales radiactivos.

### Material potencialmente infeccioso

El suero humano utilizado en este producto ha sido analizado con métodos aprobados y no ha presentado positividad para anticuerpos frente a los virus de Inmunodeficiencia Humana (Anti-HIV-1/2) y Hepatitis-C (HCV), anticuerpos anti-Treponema y el antígeno de superficie de la Hepatitis-B (HBsAg). Ninguno de los métodos analíticos disponibles actualmente puede garantizar por completo la eliminación de posibles riesgos biológicos. Se deben manipular todos los reactivos y muestras de sangre como material potencialmente infeccioso.

El suero bovino utilizado en este producto proviene de países donde no se ha reportado la encefalopatía esponjiforme. No obstante, los componentes que contienen suero animal deben considerarse como material potencialmente infeccioso.

### Peligro químico

Algunos componentes de este juego contienen azida sódica como preservante. Al verter los desechos no radiactivos al sistema de desagüe se debe diluir con grandes cantidades de agua, para evitar la acumulación de azidas metálicas explosivas en las tuberías de plomo y cobre. Este producto contiene en total 68 mg de azida sódica.

**MSDS:** La hoja de datos de seguridad está disponible públicamente en el sitio web [www.izotop.hu/immunoassay](http://www.izotop.hu/immunoassay).

## Literatura

1: Vrinda C, Paradar SN, Jyotsna N, Sivaprasad N. Immunoradiometric assay (IRMA) for human follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) using common avidin solid phase. *J Immunoassay Immunochem.* 2003;24(3):285-99.

2: Carson SA, Kallen AN. Diagnosis and management of infertility: A Review. *JAMA.* 2021 Jul 6;326(1):65-76.

3: Padmanabhan V, Cardoso RC. Neuroendocrine, autocrine, and paracrine control of follicle-stimulating hormone secretion. *Mol Cell Endocrinol.* 2020 Jan;15:500:110632.

4: Winter WE, McCormack A, Bertholf RL. Pituitary function and pathophysiology. In: Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT (eds.) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.* Elsevier, 6<sup>th</sup> edition, 2018; pp.1492-1529.









5: Rose M.P, Gaines-Das RE. Characterisation, calibration and comparison by international collaborative study of international standards for the calibration of therapeutic preparations of FSH. *J. Endocrinol* 1998 Jul;158(1):97-114.

6: CLSI. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline—Third Edition. CLSI document EP05-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.

7: CLSI. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. CLSI document EP06-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2003.

8: CLSI. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document EP07-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2005.

9: CLSI. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

	Fecha de vencimiento	<input type="text" value="LOT"/>	Número de lote
	Almacenar entre 2 y 8 °C	<input type="text" value="CONTROL"/>	Suero Control
	Precaución	<input type="text" value="CAL"/>	Calibrador
	Peligro biológico	<input type="text" value="CT"/>	Tubos recubiertos
	Consulte las instrucciones	<input type="text" value="TRAC"/>	Trazador
	Dispositivo para diagnóstico <i>in vitro</i>	<input type="text" value="WASHB"/>	Tampón de lavado
	Fabricante		Material radiactivo
<b>REF</b>	Número de referencia		



Sitio WEB: <http://www.izotop.hu>

E-mail técnico: [immuno@izotop.hu](mailto:immuno@izotop.hu)

E-mail comercial: [commerce@izotop.hu](mailto:commerce@izotop.hu)

**IZOTOP**

INSTITUTE OF ISOTOPES Ltd.

1535 Budapest. Pf.: 851.

Tel.: +36 1 392-2577, Fax: +36 1 395-9247

Edición: Septiembre/2024