

INSTRUÇÕES DE USO - FSH

FSH EIA MBIOLOG

Teste imunoenzimático para determinação quantitativa do hormônio foliculo estimulante (FSH) no soro humano.

Teste para 96 determinações

SUMÁRIO

O Hormônio foliculo estimulante (FSH), secretado pela hipófise, é uma glicoproteína de 35,5 kDa, composta por 2 subunidades polipeptídicas. A subunidade α é compartilhada por outros hormônios glicoproteicos como FSH, LH e hCG, enquanto a subunidade β é específica do FSH, sendo responsável pela atividade biológica.

Na mulher, o FSH estimula o crescimento dos folículos ovarianos, preparando-os para a ação do LH, além de aumentar a liberação de estrógeno induzido pelo LH. Os níveis de FSH se elevam após a menopausa, castração e em falha ovariana prematura.

No homem, o FSH estimula os canais seminíferos e o crescimento testicular, estando envolvido nos estágios iniciais da espermatogênese. Elevados níveis de FSH são encontrados em casos de oligospermia, falha testicular primária e na Síndrome de Klinefelter. Em tumores testiculares, normalmente a concentração sérica de FSH está diminuída, mas o nível de LH encontra-se elevado.

Também podem ser observadas concentrações aumentadas de FSH em casos de inanição, falha renal, hipertireoidismo e cirrose.

A metodologia de imunensaio enzimático (ELISA) fornece ótima sensibilidade e requer poucas manipulações, em uma determinação direta da concentração de FSH.

PRINCÍPIO

Neste método, os soros-padrão e as amostras de soro em análise são adicionados aos respectivos pocinhos da microplaca, que foram previamente recobertos com streptoavidina. Anticorpos policlonais anti-FSH conjugados à peroxidase e anticorpos monoclonais anti-FSH conjugados à biotina são adicionados e os reagentes são misturados. Os anticorpos reconhecem o hormônio existente, formando complexos que se ligam às moléculas de streptoavidina imobilizadas na placa. Após a etapa de incubação, o excesso de reagentes não imobilizados é eliminado na lavagem, e o substrato enzimático é adicionado. A hidrólise do substrato pela peroxidase gera uma reação de cor azul, que é transformada em amarela com a adição da solução de parada. A intensidade da cor, cuja absorbância é lida a 450 nm, é diretamente proporcional à quantidade de FSH existente. Através da construção da curva-padrão, é possível determinar quantitativamente a concentração do hormônio nas amostras.

Tempo total de incubação: 1 hora e 15 minutos.

COMPONENTES DO KIT

- ◆ Material suficiente para 96 determinações
- 1. **MICROPLACA:** 12 tiras de 8 pocinhos cada, marcados com streptoavidina, dispostas em suporte
Pronta para uso
- 2. **PADRÕES DA CURVA:** soro humano diluído em tampão com conservante, contendo FSH nas concentrações:
PADRÃO A: 0 mUI/mL, 0,5 mL
PADRÃO B: 5 mUI/mL, 0,5 mL
PADRÃO C: 10 mUI/mL, 0,5 mL
PADRÃO D: 25 mUI/mL, 0,5 mL
PADRÃO E: 50 mUI/mL, 0,5 mL
PADRÃO F: 100 mUI/mL, 0,5 mL
Prontos para uso
- 3. **CONJUGADO:** 13 mL, anticorpos policlonais anti-FSH conjugados à peroxidase, anticorpos monoclonais anti-FSH conjugados à biotina, em solução tampão com estabilizantes, conservantes e corante
Pronto para o uso
- 4. **SOLUÇÃO DE LAVAGEM:** 20 mL, solução tampão com conservantes
Concentrada 50x
- 5. **SUBSTRATO:** 12 mL, 3,3',5,5'-tetra-metil-benzidina (TMB) em solução tampão contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂).
Pronto para uso
- 6. **SOLUÇÃO DE PARADA:** 8 mL, ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,5 M
Pronta para uso
- 7. **FOLHAS ADESIVAS:** 2 unidades
- 8. **MANUAL DE INSTRUÇÕES DE USO**

ARMAZENAMENTO

- Armazenar o kit entre +2 e +8° C.
- As tiras da microplaca não utilizadas devem ser protegidas da umidade, mantidas na embalagem original selada, com o dessecante.
- Os reagentes são estáveis até o prazo de validade do kit, se conservados adequadamente.
- Após abertos, todos os componentes do kit são estáveis por 60 dias, se conservados entre +2 e +8° C.
- Não expor os reagentes à luz solar ou luz forte durante o armazenamento ou utilização. Manter o substrato sempre ao abrigo da luz.

MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO INCLuíDOS NO KIT

- Água deionizada
- Micropipetas e ponteiros descartáveis
- Agitador tipo vórtex
- Papel absorvente
- Cronômetro
- Sistema de lavagem manual ou automático com capacidade para 300 µL
- Leitora de microplacas com filtros a 450 nm e, se possível, 620-630 nm

PRECAUÇÕES DE USO

Somente para o uso em diagnóstico *in vitro*

MATERIAIS POTENCIALMENTE INFECCIOSOS

- Os controles, contendo componentes de natureza humana, foram testados e determinados como não-reativos para HBsAg, bem como para os anticorpos contra HCV e HIV. Apesar disto, não há nenhum método de teste que possa oferecer completa confiabilidade para ausência do vírus do HIV e da Hepatite B ou de outros agentes infecciosos. Portanto, estes reagentes devem ser manipulados como materiais potencialmente infecciosos.
- Usar luvas. Não pipetar com a boca. Não fumar, comer ou beber em áreas onde amostras ou reagentes do kit estão sendo manuseados.
- Evitar o contato do substrato com agentes oxidantes ou superfícies metálicas, usando recipientes plásticos descartáveis limpos ou estéreis.
- Manusear a solução de ácido sulfúrico com cautela. Se houver contato com olhos e pele, lavar com água em abundância e procurar orientação médica.
- Os restos de amostras, reagentes e líquido de descarte devem ser descontaminados com solução desinfetante, tal como hipoclorito de sódio 5%, antes de serem desprezados.

COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

- É aconselhável usar amostras colhidas em jejum matutino, para termos de comparação com os valores normais estabelecidos.
- Coletar as amostras de sangue sem aditivos ou barreira de gel. Após a coagulação, processá-las imediatamente para obtenção de soros sem hemólise.
- Evitar o uso de soros hemolisados, ictericos ou lipêmicos.
- As amostras devem ser refrigeradas de +2 a +8° C por no máximo 5 dias, ou congeladas a -20° C por até 30 dias. Evitar congelar e descongelar mais de uma vez.

PROCEDIMENTO

Operações prévias

1. Antes da realização do teste, estabilizar todos os componentes do kit, controles e amostras à temperatura ambiente (+20 a +27 C), e homogeneizar suavemente.
2. **Solução de lavagem diluída:** diluir 1 parte da solução concentrada (50x) para 49 partes (1:50) de água deionizada (exemplo: 10 mL + 490 mL), e estocar em frasco adequado.

A solução concentrada permite a preparação de um volume total de 1000 mL (1 litro) de *solução de lavagem diluída*. Cristais na solução concentrada desaparecerão após aquecimento em banho-maria a 37° C.

Armazenar a solução diluída entre +2 e +8° C.

3. Deixar que a microplaca atinja a temperatura ambiente antes de abrir a embalagem. Separar somente as tiras necessárias à realização do teste, retornando as restantes para a embalagem com dessecante e selando. Reservar dois pocinhos (duplicatas) para cada padrão, controles internos do laboratório e amostras.

Exemplo: pocinhos A1 e A2 para o *padrão A*, B1 e B2 para o *padrão B*, C1 e C2 para o *padrão C*, D1 e D2 para o *padrão D*, E1 e E2 para o *padrão E*, F1 e F2 para o *padrão F*, G1 e G2 para o *controle "X"*, etc.

Realização do teste

1. Dispensar 50 µL dos padrões, controles internos do laboratório e amostras nos respectivos pocinhos (em duplicata).
2. Adicionar 100 µL dos anticorpos conjugados a cada pocinho.
3. Agitar a placa gentilmente por 20 a 30 segundos, para homogeneizar. Cobrir com a folha adesiva e incubar por 1 hora à temperatura ambiente (+20 a +27° C).
4. Descartar o conteúdo de todos os pocinhos por aspiração ou decantação. Adicionar 300 µL da solução de lavagem diluída, aspirar ou decantar, e repetir o processo mais 2 vezes (total de 3 lavagens). Esta etapa deve ser realizada adequadamente, para garantir resultados confiáveis e precisos. Remover o fluido restante, batendo vigorosamente a placa invertida sobre folhas de papel absorvente. Se a remoção do líquido for feita por decantação, a placa deve ser seca em papel absorvente a cada lavagem.
5. Dispensar 100 µL do substrato em cada pocinho. Dispensar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar os efeitos de tempo de reação entre os poços.
6. Cobrir novamente com a folha adesiva e incubar por exatamente 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz.
7. Adicionar 50 µL da solução de parada a cada pocinho, na mesma ordem usada anteriormente. Agitar a placa gentilmente por 15 a 20 segundos, para homogeneizar.
8. Ler a absorbância a 450 nm, dentro de máximo 30 minutos. Usar a absorbância de 620-630 nm para minimizar as imperfeições da placa.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

Através da construção de uma curva dose-resposta usando os padrões fornecidos no kit (**curva-padrão**), é possível calcular a concentração de FSH nas amostras testadas. Isso pode ser feito com auxílio de qualquer programa de computador que faça gráficos, ou à mão, em papel milimetrado.

1. Registrar em uma tabela os valores de absorbância a 450 nm para cada pocinho correspondente aos padrões, controles ou amostras. Calcular a **absorbância média** das duplicatas: $(Abs_1 + Abs_2) / 2$.
2. Para construir a **curva-padrão**, utilizar os valores de absorbância de cada duplicata dos padrões, não o valor médio das duplicatas. Plotar em um gráfico a **absorbância** das duplicatas dos padrões (eixo Y vertical) em função da **concentração** de FSH em

- mUI/mL correspondente (eixo X horizontal). Estabelecer o melhor traçado para a **curva-padrão**.
3. Determinar a concentração de FSH (em mUI/mL) para cada controle ou amostra, projetando a **absorbância média** das duplicatas sobre a curva-padrão.

CONTROLE DE QUALIDADE

- O teste executado é considerado **válido** observando-se os seguintes critérios:
 - ◆ a absorbância do **padrão F** (100 mUI/mL) deve ser **maior ou igual a 1,3**
 - ◆ quatro de cada 6 controles internos devem apresentar valores dentro dos limites esperados
- A cada ensaio, é necessário repetir a curva-padrão. Se mais de uma placa for usada, cada uma deve ter sua própria curva-padrão.
- Cada laboratório deve estabelecer seus próprios critérios para interpretação dos testes, baseando-se na população em estudo. Para monitorar a performance do teste, é aconselhável incluir controles internos correspondentes aos valores limites de hipotireoidismo, eutireoidismo e hipertireoidismo. Estes controles devem ser tratados como as demais amostras e seus valores determinados a cada ensaio.
- É aconselhável manter registros de Controle de Qualidade, para monitorar a performance dos reagentes em uso. Testes estatísticos adequados devem ser utilizados para verificar a reprodutibilidade dos ensaios. Diferenças significativas podem indicar alterações inobservadas nas condições experimentais ou degradação dos reagentes do kit. Reagentes frescos devem ser usados para determinar a razão das variações.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Performance do ensaio

- Amostras com contaminação microbiológica, lipêmicas, ictericas ou hemolisadas podem causar resultados errôneos, portanto, não devem ser utilizadas. As soluções do kit devem estar límpidas, livres de contaminação microbiológica, e dentro do prazo de validade. Não devem ser utilizados componentes de diferentes lotes ou reagentes de outros fabricantes. Evitar a contaminação cruzada entre amostras e entre reagentes do kit.
- Para que os resultados sejam reprodutíveis, as instruções dadas devem ser rigorosamente seguidas, respeitando os limites de tempo e temperatura das incubações. A pipetagem deve ser precisa, evitando diferenças entre as duplicatas. Para que não ocorram variações significativas nos tempos de incubação, a pipetagem das amostras não deve exceder 10 min, e a adição dos reagentes deve ser efetuada sempre na mesma sequência. Falhas nos procedimentos de lavagem podem levar a resultados inválidos.
- A leitora de microplacas mede a absorbância na vertical. Evitar tocar o fundo dos pocinhos.
- Em caso de dúvidas, contatar o Serviço de Atendimento ao Cliente, tendo em mãos o nome e código do produto, bem como o número de lote impresso em cada um dos componentes do kit.

Interpretação

- O resultado do teste obtido utilizando este kit serve apenas como auxiliar ao diagnóstico clínico e deve ser interpretado associando-se às histórias clínicas dos pacientes, achados clínicos e outros procedimentos de diagnóstico.

- A produção do FSH é suprimida pelo estrógeno, mas em mulheres que façam uso de contraceptivos orais, o nível deve estar normal ou baixo. Dietas rigorosas ou excessiva perda de peso podem levar a concentrações reduzidas de gonadotrofina.
- A regulação da concentração do FSH depende de inúmeros fatores além da homeostase da hipófise. Portanto, a concentração deste hormônio não é suficiente para determinar o estado clínico.

VALORES ESPERADOS

- Para determinar os valores esperados neste teste por ELISA para Hormônio foliculo estimulante, foi realizado um estudo em uma população adulta aparentemente normal. Os valores esperados são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 - Valores esperados para ELISA para FSH (em mUI/mL)

Mulheres	
Fase folicular	3,0 - 12,0
Meio do ciclo	8,0 - 22,0
Fase lútea	2,0 - 12,0
Pós-menopausa	35,0 - 151,0
Homens	
	1,0 - 14,0

- É importante ressaltar que o estabelecimento de uma faixa de valores esperados para uma população, usando um determinado método, depende de vários fatores, tais como a especificidade do método, a população testada e a precisão na execução do método. Por estas razões, cada laboratório deve tentar estabelecer sua própria faixa de valores esperados usando a população em estudo.

PERFORMANCE

Precisão

Para determinar a precisão intra-análise e inter-análise, foram testados *pools* de soros-controle com diferentes níveis de FSH. O número de amostras (N), valores médios (X), desvio-padrão (dp) e coeficiente de variação (cv) para cada controle estão representados nas Tabelas 2 e 3.

TABELA 2 - Precisão Intra-análise (em mUI/mL)

Amostra	N	X	dp	cv
nível 1	16	5,9	0,25	4,3%
nível 2	16	16,0	0,68	4,3%
nível 3	16	41,3	1,18	2,9%

TABELA 3 - Precisão Inter-análise (em mUI/mL)

Amostra	N	X	dp	cv
nível 1	10	5,9	0,41	6,9%
nível 2	10	16,0	0,48	3,0%
nível 3	10	40,9	1,48	3,6%

N = experimentos em duplicata

Análise comparativa

Este teste de ELISA para FSH foi comparado com método análogo por radioimunoensaio. Foram utilizadas amostras biológicas (N = 106) com nível de hormônio alto, médio e baixo. As médias, a equação de regressão e o coeficiente de correlação obtidos, apresentados na Tabela 4, indicam o alto grau de concordância entre os métodos.

TABELA 4 - Análise comparativa

Método	Média	Equação de regressão	Coefficiente de correlação
ELISA (x)	17,4	$y = 0,98 (x) - 1,7$	0,978
referência (y)	19,4		

Sensibilidade

A sensibilidade deste teste de ELISA para FSH foi calculada em 0,02 mUI, ou equivalente a uma amostra contendo 0,8 mUI/mL.

Especificidade

A possível reatividade cruzada deste método de ELISA para FSH foi calculada como a razão entre a dose de substância interferente e a dose de hormônio necessária para obter a mesma absorbância.

TABELA 5 - Reatividade Cruzada

Substância	Reatividade cruzada	Concentração
FSH	1,0000	--
LH	< 0,0001	1000 ng/mL
hCG	< 0,0001	1000 ng/mL
TSH	< 0,0001	1000 ng/mL

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Saxema BB et al. J Clin Endocrinol Metab 28: 591, 1968.
2. Winter JS & Faiman C. J Clin Endocrinol Metab 37: 714, 1973.
3. Odell WD et al. J Clin Invest 47: 2551, 1981.
4. Wide L. Ups J Med Sci 86: 249, 1981.
5. Wennink JM et al. Clin Endocrinol 33: 333, 1990.
6. Robertson DR. Endocrinol 129: 1805, 1991.
7. Berger P et al. Mol Cell Endocrinol 125: 33, 1996.
8. Layman LC et al. N Engl J Med 337: 607, 1997.
9. Simoni M et al. Endocr Rev 18: 739, 1997.
10. Vitt UA et al. Biol Reprod 59: 854, 1998.

DISTRIBUIDO POR: **BTI – Bio Tecnologia Industrial Ltda –**

CNPJ: 03654699000100

Av. José Cândido da Silveira 2100 - sl 10 – Horto – 30130-780 - Belo Horizonte, MG, Brasil
– Resp. Técnico: Dr. Luiz Eduardo De Nicola - CRBM 1452.

FABRICADO POR: **MBiolog Diagnóstica Ltda –**

CNPJ: 03590360000189

Rua Gama, 337 – Bairro Vila Paris – Contagem – 32372-120 – Belo Horizonte, MG, Brasil –
Resp. Técnico: Dr. Fabrício Galvão de Brito – CRF-MG 9587.

ANVISA: 80047580100