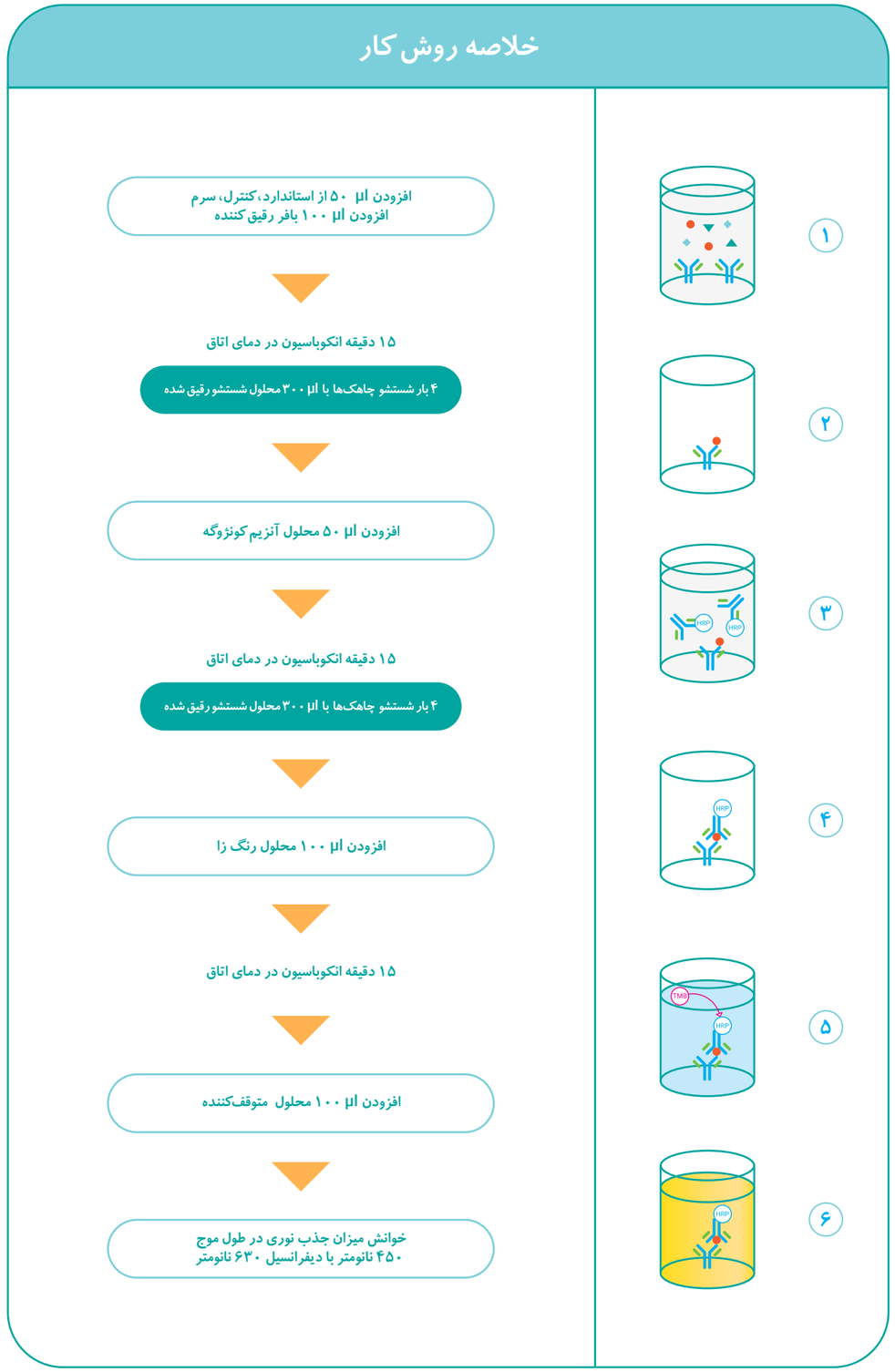
خلاصه روش کار



کاربرد

اندازه‌گیری غلظت FSH در سرم یا پلاسمای انسانی به‌روش ایمونوآنزیماتیک
(Cat.No. DG.FSH.01) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

مقدمه

ساختار و نقش فیزیولوژیک: هورمون محرک فولیکول یا FSH (Follicle stimulating hormone) گلیگو پروتئینی با وزن مولکولی ۳۳۵۰۰ دالتون، دارای ۲۰۷ اسید آمینه و سه زنجیره کربوهیدراتی است. این گنادوتروپین که از سلولهای بازوفیل بخش پیشین هیپوفیز ترشح می شود، از دو زنجیره α و β تشکیل شده است که با پیوندهای غیرکوالانسی به هم متصل‌اند. زنجیره α متشکل از ۸۹ اسید آمینه، از لحاظ ساختار مولکولی با هورمونهای hCG (Human chorionic gonadotropin) TSH (Thyroid stimulating hormone) و LH (Luteinizing hormone) مشابه است. خصوصیات هورمونی و ایمونولوژیکی FSH توسط زیرواحد اختصاصی β ایجاد می شود. تولید FSH توسط هورمون رها کننده گنادوتروپین هیپوتالاموس (GnRH, Gonadotropin releasing hormone) کنترل می گردد. نیمه عمر بیولوژیکی FSH به صورت *in vivo* ۳-۴ ساعت است. [۱،۲]

نقش FSH درزنان، القای رشد و بلوغ فولیکول رسیده است. در سیکل قاعدگی سطح سرمی FSH از یک شکل دوره ای تبعیت می کند که منطبق بر غلظت سرمی پروژسترون و استرادیول است. مقادیر این هورمون به فاصله زمانی کوتاهی قبل از تخمک گذاری، یعنی در اواسط سیکل قاعدگی بطور واضحی افزایش می یابد. این فرآیند که با افزایش غلظت سرمی LH همراه است، باعث پاره شدن فولیکول بالغ می گردد. در خانمهای یائسه به دلیل پایین بودن سطح سرمی هورمونهای استروئیدی فیدبک منفی غیر فعال بوده و تولید این هورمون به صورت مستمر ادامه دارد. این هورمون با سطح سرمی یکنواخت در مردان تنظیم کننده اسپرماتوژنزسلول های سرتولی است. [۳،۴]

کاربرد بالینی: اندازه گیری سطح سرمی FSH در خانمها در علت یابی ناباروری، اختلالات عادت ماهانه از جمله آمنوره اولیه و ثانویه، ارزیابی کارکرد گنادوتروپیک هیپوفیز قدامی، در افتراق بین علت نارسایی اولیه و ثانویه گنادی کاربرد دارد. علاوه بر آن سنجش FSH شاخص مناسبی جهت بررسی آغاز یائسگی در خانمهاست که با افزایش میزان FSH و کاهش هورمونهای استروئیدی همراه است. در سندرم تخمدان پلی کیستیک (POCS, Polycystic ovaries syndrome) اندازه گیری FSH بهتر است به همراه LH انجام گیرد، در این سندرم در غالب خانمها نسبت LH/FSH بالاتر از افراد طبیعی است. در آقایان سنجش این هورمون در بررسی ناباروری، هیپوگنادیسم، ژنیکوماستی حائزاهمیت است. [۵،۶]

موارد افزایش این هورمون در هیپوگنادیسم اولیه، آنورکیا، نارسایی گنادی، سندرم کلاین- فلتر و در بعضی از موارد بلوغ زودرس دیده می شود.

کاهش این هورمون همسو با کاهش LH و استروئیدها در پان هیپوپیتوتاریسم (Panhypopituitarism) دیده می شود. [۳،۷]

اساس روش سنجش

مدت زمان انجام تست: ۱۵ دقیقه + ۱۵ دقیقه+ ۱۵ دقیقه

طراحی کیت FSH بر اساس روش ایمونوآنزیماتیک ساندویچی با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلنال می‌باشد. در این روش آنتی‌ژن مورد سنجش طی دو مرحله بین آنتی‌بادی تثبیت شده در ته چاهک‌های پلی‌استایرنی و آنتی‌بادی دوم متصل به آنزیم پراکسیداز(HRP) که شاخص‌های‌آنتی ژنیک متمایزی را روی مولکول FSH شناسایی می کنند، قرار می گیرد. پس از شستشو و خارج کردن آنالیت‌های غیرمتصل با افزودن سوبسترا، تترامتیل بنزیدین (TMB)، آنزیم رنگ آبی ایجاد می کند. با اضافه نمودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شود. شدت رنگ ایجاد شده که با غلظت FSH ارتباط مستقیم دارد، در طول موج **۴۵۰** نانومتر (با دیفرانسیل **۶۳۰** نانومتر) اندازه‌گیری می گردد.

توجه و احتیاط

- این کیت تشخیصی به صورت *in vitro* قابل استفاده می‌باشد.
- کلیه محلول‌های کیت آماده مصرف هستند، فقط محلول شستشوی غلیظ (20x) قبل از استفاده نیاز به رقیق‌سازی دارد.
- اجزای اختصاصی این کیت برای مصرف با اجزای هم سری ساخت کیت ارائه شده‌اند.
- اجزای عمومی کیت شامل محلول‌های شستشو، رنگ زا و متوقف‌کننده می‌باشند که برای سایر محصولات دیازیست نیز قابل استفاده هستند.

به‌منظور رقیق‌سازی نمونه می‌بایست از "محلول استاندارد صفر" کیت مربوطه، استفاده گردد.

- جهت کاهش پدیده تأخیری، ضرورت دارد زمان انجام مرحله اول تست در کمتر از **۱۰** دقیقه انجام شود.
- توصیه می‌شود در هر تست استانداردها جهت رسم منحنی استفاده شوند، همچنین درصورتی که همزمان بیش از یک پلیت تست گذاشته شود، رسم منحنی برای هر پلیت ضروری است.
- کالیبره بودن ابزارها و دستگاه‌ها در صحت نتایج اثرگذار است.
- جهت ساخت اجزای این کیت از مواد شیمیایی و زیستی استفاده شده است. لذا توصیه می‌شود هنگام کار از تماس مستقیم با مواد پرهیز شود.

محتویات کیت

اجزای تشکیل دهنده کیت ۹۶ تستی FSH به شرح زیر می باشد:

ردیف	نام اجزاء	مقدار/تعداد
۱	پلیت پوشانده شده با آنتی‌بادی مونوکلنال ضد FSH (Anti-FSH Antibody Coated Microtiter Plate)	1/96 wells
۲	استاندارد A (Standard A)	1/4 ml
۳	استانداردهای B-F (Standards B-F) کالیبراسیون برمبنای استاندارد WHO (1st IS 83/575)	5/1 ml
۴	کنترل پایین و بالا (Controls Low & High) کالیبراسیون برمبنای استاندارد WHO (1st IS 83/575)	2/1 ml
۵	محلول بافر رقیق کننده (Assay Buffer)	1/12 ml
۶	محلول شستشوی غلیظ (Concentrated Wash Buffer)	1/25 ml
۷	محلول آنزیم (HRP) کونژوگه شده به آنتی بادی ضدFSH (Anti-FSH Antibody- HRP Conjugate)	1/6 ml
۸	محلول رنگ زا (TMB Substrate)	1/12 ml
۹	محلول متوقف‌کننده (Stop Solution)	1/12 ml

شرایط نگهداری و پایداری

- کیت را در دمای **۸-۲** درجه سانتیگراد نگهداری کنید.
- پایداری کیت در دمای **۸-۲** درجه سانتیگراد، قبل از شروع استفاده (In Shelf) و حین استفاده(In use) بر مبنای استاندارد CLSI (EP25 ـA) [۸] بررسی گردید که نتایج به شرح زیر می‌باشد:

قبل از شروع استفاده (In Shelf)	تا پایان تاریخ انقضا
حین استفاده (In use)	تا ۶ ماه

جمع آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه مورد نیاز جهت اندازه‌گیری FSH، سرم یا پلاسمای به‌دست آمده با مواد ضد انعقاد هپارین، سیترات سدیم و EDTA می‌باشد. جهت پایداری نمونه‌ها از سدیم ازاید(Sodium Azide) استفاده نشود. نمونه ها در دمای **۸-۲** درجه سانتیگراد تا **۱۴** روز و در دمای **۲۰-** درجه سانتیگراد تا شش ماه قابل نگهداری هستند. [۹] از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه‌ها پرهیز نمایید. جهت اندازه‌گیری FSH نمونه‌های منجمد شده، ابتدا نمونه را در دمای اتاق ذوب و بعد با حرکت دست یکنواخت نمایید. در صورتی که غلظت نمونه‌ای بیش از آخرین استاندارد باشد، جهت اندازه‌گیری دقیق آنالیت، ابتدا نمونه را با **"محلول استاندارد صفر"** رقیق و نمونه رقیق شده را مجدد تست کنید. در محاسبه غلظت نهایی این نمونه ها، ضریب رقت را منظور نمایید.

مواد و وسایل لازم که همراه کیت عرضه نمی شوند

- دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر **۴۵۰** و**۶۳۰** نانومتر کالیبر شده
- سمپلرهای **۱۰۰** و **۵۰** میکرولیتر کالیبر شده
- سرسمپلرهای یک‌بار مصرف
- آب مقطر برای رقیق سازی محلول شستشوی غلیظ

روش انجام تست

قبل از انجام تست:

- تمام مواد و نمونه ها را به دمای اتاق (**۲۵-۲۰** درجه سانتیگراد) برسانید.
- برای تهیه محلول شستشوی قابل مصرف، یک حجم محلول شستشوی غلیظ(20x) را با **۱۹** حجم آب مقطر رقیق نمایید.

کیت سنجش FSH

DiaZist

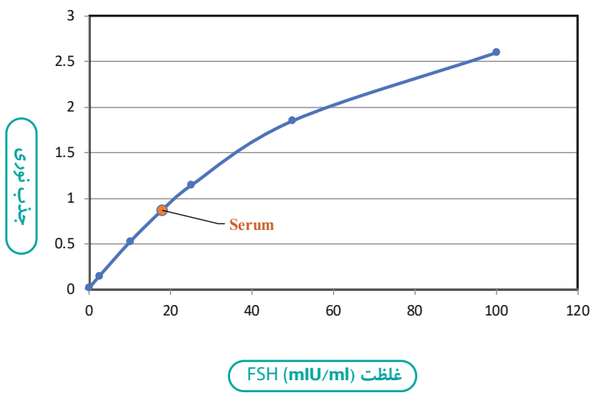
مراحل انجام تست :

۱. ۵۰ میکرولیتر از هر استاندارد، کنترل و نمونه سرم به چاهک مربوطه بریزید.
۲. ۱۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده به هر چاهک اضافه نمایید و پلیت را ۱۵ ثانیه تکان دهید.
۳. روی چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پوشانده و مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۴. چاهک‌ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.
۵. به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول آنزیم کونژوگه اضافه نمایید.
۶. روی چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پوشانده و مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۷. چاهک‌ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.
۸. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگ زا اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۹. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده اضافه نمایید و بعد از مخلوط کردن به مدت ۱۵ ثانیه، میزان جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر، حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، بخوانید.

محاسبه نتایج

غلظت FSH نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد (رسم به‌صورت دستی یا دستگاه الایزا ریدر) تعیین می‌گردد. در این منحنی جذب نوری استانداردها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر بر روی محور عمودی (Y) و غلظت آن‌ها را بر حسب mIU/ml بر روی محور افقی (X) مشخص کنید و بر اساس آن منحنی را رسم نمایید. با استفاده از منحنی ترسیم شده و جذب نوری بدست آمده از نمونه، غلظت FSH آن قابل محاسبه می‌باشد. جدول و نمودار زیر به عنوان مثال ارائه شده است.

نمونه	جذب نوری	میانگین جذب نوری	غلظت FSH (mIU/ml)
استاندارد A	۰/۰۱۲	۰/۰۱۱	۰
	۰/۰۱۱		
استاندارد B	۰/۱۴۳	۰/۱۴۱	۲/۵
	۰/۱۳۹		
استاندارد C	۰/۵۲۵	۰/۵۱۷	۱۰
	۰/۵۰۹		
استاندارد D	۱/۱۳۴	۱/۱۱۳	۲۵
	۱/۰۹۳		
استاندارد E	۱/۸۶۲	۱/۸۵۰	۵۰
	۱/۸۳۸		
استاندارد F	۲/۵۹۶	۲/۵۹۹	۱۰۰
	۲/۶۰۲		
کنترل پایین	۰/۱۳۷	-	۲/۴۷
کنترل بالا	۱/۸۹۲	-	۵۱/۳۴
سرم	۰/۸۶۴	-	۱۷/۸۵



کنترل کیفی

تست در صورتی تأیید می‌گردد که:

- جذب نوری استاندارد صفر کمتر از ۰/۰۹ باشد.
- جذب نوری استاندارد آخر بیش از ۱/۴ باشد.
- خوانش کنترل‌های پایین و بالای کیت در محدوده مورد قبول باشد.
- توصیه می‌گردد جهت حصول اطمینان از نتایج کیت، علاوه بر کنترل‌های ارائه شده در کیت، به صورت دوره‌ای از کنترل‌های دقت و صحت تجاری نیز استفاده گردد. بدیهی است نتایج بدست آمده بایستی در محدوده مورد قبول قرائت گردد.

تداخل‌ها و محدودیت‌ها

- جهت بررسی اختصاصیت آنتی بادی به کار رفته در این کیت، اثر تداخلی آنالیتهای هورمونی TSH (تا ۱۰۰ µIU/ml)، LH (تا ۲۰۰ mIU/ml)، hCG (تا ۲۵۰,۰۰۰ mIU/ml) و GH (تا ۱۰۰ ng/ml) بررسی گردید. نتایج در جدول زیر آمده است.

ماده افزوده شده	درصد تداخل (Cross-reactivity)
TSH	<۰/۱
LH	<۰/۱
hCG	<۰/۱
GH	<۰/۱

- اثر تداخلی بیلی روبین (تا ۲۰ mg/dl)، هموگلوبین (تا ۵۰۰ mg/dl)، تری گلیسیرید (تا ۳۰۰۰ mg/dl) و فاکتورهای روماتوئید(تا ۲۰۰۰ IU/ml) در سرم کمتر از ۵٪ می باشد.
- در این کیت برای نمونه‌های رقیق نشده تا غلظت (تا ۲۰۰۰ mIU/ml) اثر هوک دیده نشد.
- نمونه سرم یا پلاسمای افرادی که سابقه درمان یا تشخیص بیماری با مواد حاوی آنتی‌بادی مونوکلنال موش داشته‌اند، می‌تواند حاوی آنتی بادی‌های انسانی ضد موش (HAMA) باشد. با توجه به غلظت آنتی‌بادی و مواد بازدارنده مورد استفاده در این کیت، واکنش‌های تداخلی غیر اختصاصی به حداقل رسیده و تا کنون واکنش مثبت کاذب مشاهده نشده است.
- محدوده قابل اندازه‌گیری غلظت FSH با این کیت، ۰/۲ –۱۰۰ mIU/ml می‌باشد.

مقادیر طبیعی

دامنه مقادیر طبیعی با اندازه گیری غلظت FSH، ۷۹۷ نمونه افراد سالم تعیین گردید.

جنسیت		تعداد	5% to 95% Interval (mIU/ml)
زنان قبل از یائسگی:	فاز فولیکولر	۱۵۲	۳/۳-۱۱/۲
	فاز تخمک گذاری	۶۹	۴/۳-۲۱/۲
	فاز لوتئال	۱۷۰	۱/۶-۷/۲
زنان بعد از یائسگی		۱۸۹	۲۶/۳-۱۳۴/۲
مردان		۲۱۷	۱/۲-۱۲/۵

قابل ذکر است که جدول فوق یک راهنمای کلی است و توصیه می‌گردد هر آزمایشگاه با اندازه‌گیری غلظت FSH افراد سالم، مقادیر طبیعی مرجع خود را تعیین و از آن برای تفسیر نتایج استفاده نماید.

ویژگی‌های اختصاصی کیت

۱. حساسیت: حداقل غلظت قابل اندازه گیری FSH که از نمونه فاقد آنالیت قابل تمایز باشد را حساسیت گویند. این مقدار که بر اساس میانگین غلظت استاندارد صفر بعلاوه دو برابر انحراف معیار محاسبه گردیده است (**بدست آمده از ۱۰ تست**)، ۰/۲ mIU/ml می‌باشد.

۲. صحت: غلظت FSH، ۲۷۱ نمونه تصادفی با کیت دیازیست و روش مرجع (ELFA) اندازه گیری شد. نتایج بدست‌آمده از مقایسه دو روش ضریب همبستگی خطی (r) ۰/۹۹ را نشان می دهد. غلظت نمونه ها با کیت دیازیست بین ۱/۳۳ mIU/ml تا ۹۹/۰۵ و با روش مرجع ۱/۱۴ mIU/ml تا ۹۹/۴۵ بود. نتایج مقایسه دو روش به شرح زیر است:

کیت سنجش FSH

DiaZist

Slope	Intercept	غلظت نمونه‌ها (mIU/ml)	تعداد نمونه	روش
۰/۹۹۲	-۰/۰۵۸	۱-۱۰۰	۲۷۱	Passing/Bablok
۰/۹۸۴	۰/۲۹۲	۱-۱۰۰	۲۷۱	Linear Regression

۳. دقت: شاخص دقت این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP5 -A2)[10] ارزیابی گردیده است. بدین منظور میزان FSH، ۳ نمونه سرمی با غلظت‌های مختلف اندازه‌گیری و انحراف معیار و ضریب تغییرات محاسبه گردید که در جدول زیر آمده است:

شماره نمونه	تعداد سنجش	میانگین غلظت (mIU/ml)	Within Run		Total	
			SD	٪CV	SD	٪CV
۱	۶۰	۷/۷۶	۰/۴۲	۴/۱۶	۰/۳۷	۴/۸۱
۲	۶۰	۱۸/۸۲	۰/۷۸	۳/۲۱	۰/۷۸	۴/۱۴
۳	۶۰	۳۹/۶۳	۰/۸۹	۱/۷۸	۲/۲۴	۵/۶۴

۴. خطی بودن: به منظور بررسی صحت اندازه‌گیری نمونه‌های با غلظت بالای ULoQ (upper limit of quantitation) تست خطی بودن این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP34)[11] انجام گردید. بدین منظور نمونه سرم با غلظت ۷۷/۸۳ mIU/ml با "محلول فاقد آنالیت" به صورت متوالی رقیق شد سپس غلظت‌ها با کیت FSH اندازه‌گیری گردید. درصد ریکاوری رقت که شاخص میزان دقت رقت‌گیری می باشد، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\frac{\text{غلظت اندازه‌گیری شده (mIU/ml)}}{\text{غلظت مورد انتظار (mIU/ml)}} \times ۱۰۰$$

(محدوده درصد ریکاوری بدست آمده بین ۹۱/۳ تا ۱۰۳ است)

٪ ریکاوری	غلظت اندازه گیری شده (mIU/ml)	غلظت مورد انتظار (mIU/ml)	رقت
۱۰۳	۴۰/۰۹	۳۸/۹۱	۱:۲
۹۸/۷	۱۹/۲	۱۹/۴۵	۱:۴
۹۴/۵	۹/۱۹	۹/۷۲	۱:۸
۹۱/۳	۴/۴۴	۴/۸۶	۱:۱۶

۵. بازیابی: به‌منظور بررسی اثر ماتریکس، تست بازیابی این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP34)[11] انجام گردید. بدین منظور مقادیر متفاوتی از نمونه حاوی FSH با غلظت بالا (۸۳/۲mIU/ml) به نمونه مورد بررسی حاوی FSH با غلظت پایین (۸/۴۵mIU/ml) افزوده شد. سپس غلظت نمونه‌ها با کیت FSH اندازه‌گیری گردید و درصد ریکاوری که شاخص میزان دقت بازیابی می‌باشد، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\frac{a-b}{c} \times 100$$

a: غلظت اندازه‌گیری‌شده نمونه مورد بررسی بعد از افزودن آنالیت
b: غلظت اندازه‌گیری‌شده نمونه مورد بررسی بعد از افزودن محلول رقیق‌کننده
C: غلظت آنالیت افزوده شده

(درصد ریکاوری بدست آمده بین ۹۵/۸ تا ۱۰۹/۳ است)

٪ ریکاوری	c (mIU/ml)	b (mIU/ml)	a (mIU/ml)
۱۰۹/۳	۳/۹۶	۷/۴۵	۱۱/۷۸
۹۷/۵	۷/۵۶	۷/۴۲	۱۴/۷۹
۹۵/۸	۱۳/۸۶	۷/۱۸	۲۰/۴۶
۱۰۵/۴	۲۳/۷۷	۶/۴۴	۳۱/۵

منابع

1. Mullen M.P., *et al*. Structural and functional roles of FSH and LH as glycoproteins regulating reproduction in mammalian species. Chapter 8, 2013.
2. Wide L, *et al*. Serum half-life of pituitary gonadotropins is decreased by sulfonation and increased by sialylation in women. J Clin Endocrinol Metab. 94(3): 958–964, 2009.
3. Raju G, *et al*. Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone synergy : A review of role in controlled ovarian hyper-stimulation. J Hum Reprod Sci. 6(4): 227–234, 2013.
4. Palermo R. Differential actions of FSH and LH during. folliculogenesis Reproductive bioMedicine online. 15(3), 2007.
5. Vidhya Viswanathan, *et al*. Etiology and treatment of hypogonadism in. adolescents. Pediatr Clin North Am. 58(5), 2011.
6. Sowers M, et al. Follicle stimulating hormone and its rate of change in. defining menopause transition stages. J Clin Endocrinol Metab. 93(10), 2008.
7. Yeon Kim S. Diagnosis and treatment of hypopituitarism. Endocrinol Metab. 30:443-455, 2015.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Stability of *In Vitro* Diagnostic Reagents; Approved Guideline – First Edition. NCCLS Document EP25-A. 2009.
9. DG Klinische chemie mitteilungen. 26:210,1995.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline – Second Edition. NCCLS Document EP5-A2. 2004.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Establishing and Verifying an Extended Measuring Interval Through Specimen Dilution and Spiking – First Edition. EP34. 2018.

تهران،خیابان سهروردی شمالی،خیابان افشار جوان،پلاک ۲، واحد ۱۰
تلفن ویژه: ۷۲۴۵۷-۰۲۱
office@garnimed.com
www.garnimed.com

Published: Dec. 2018