

مقدمه:

FSH یک هورمون گلیکوپروتئینی است که توسط بخش قدامی غده هیپوفیز و با تحریک هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) سنتز و ترشح می‌شود. اندام‌های اصلی هدف FSH شامل بیضه و تخمدان هستند. اندازه‌گیری سطح FSH در خون جهت ارزیابی تعادل و تنظیم چرخه قاعدگی و باروری از طریق محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد اهمیت دارد. اختلالاتی نظیر یائسگی زودرس، سندرم ترنر و نارسایی بیضه با افزایش سطح این هورمون همراه هستند. مقادیر کاهش یافته این هورمون نیز در اختلالاتی نظیر کم‌کاری هیپوفیز و هیپوتالاموس، سندرم کالمن، هایپرپرولاکتینمی و نارسایی‌های گنادوتروپین دیده می‌شود. حیطة کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی سطح FSH در نمونه سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این تست بر اساس الایزای ساندویچ طراحی شده است. در این آزمایش بی‌حرکت‌سازی کمپلکس ایمنی در سطح چاهک‌ها توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در سطح چاهک و آنتی‌بادی بیوتینیل‌مونوکلونال ضد FSH صورت می‌گیرد. با مخلوط شدن آنتی‌بادی مونوکلونال بیوتینیل‌شده، آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP و سرم حاوی آنتی‌ژن، واکنش بین آنتی‌ژن موجود در سرم و آنتی‌بادی‌ها بدون هیچ رقابتی صورت می‌گیرد و کمپلکس‌های ساندویچ به دلیل تمایل بسیار بالای بین استرپتاویدین و بیوتین به سطح چاهک متصل می‌شوند. پس از شستشو و حذف اجزاء متصل نشده، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده محصول نهایی تولید می‌شود که بیشترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد. میزان رنگ و در نتیجه شدت جذب نوری با غلظت FSH سرم ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت FSH سرم به کمک منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

(۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.

- (۲) کالیبراتورهای FSH (F-A Cal FSH): شش ویال با غلظت‌های ۵۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ mIU/mL تهیه شده از سرم انسان.
  - (۳) محلول کونژوگه آنزیمی (FSH Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی‌های متصل به بیوتین و متصل به آنزیم HRP.
  - (۴) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
  - (۵) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
  - (۶) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
  - (۷) محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
  - (۸) محلول کنترل (FSH Control): ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری.
  - (۹) برچسب مخصوص پلیت یک ورق.
- توجه ۱: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.
- توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در COA درج شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند:

- (۱) دستگاه خوانش گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
- (۲) سمپلر کالیبره.
- (۳) آب مقطر دیونیزه.

احتیاط در استفاده از کیت:

- (۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری کنید.
- (۲) تمام محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نشود.
- (۳) توجه فرمایید که محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- (۴) محتویات این کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2، HBsAg و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین با توجه به احتمال

آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شوند.

(۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است و در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جلوگیری نمایید.

(۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

- (۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم است. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نشود.
- (۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین (>5 mg/day) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.
- (۳) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حد اکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری نمایید.

آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:






- (۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری نمایید.
- (۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و

تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

روش انجام آزمایش:

- قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، کنترل‌ها و نمونه‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت کنید.
  - (۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام تست را بردارید و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگه داری کنید.
  - (۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.
  - (۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
  - (۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
  - (۵) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده، (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بریزید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت اقدام نمایید.
  - (۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) درون چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.
- توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به‌دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به‌مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

**علائم استفاده شده در پرچسب کالاها**

<b>EC REP</b>	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
<b>LOT</b>	Batch code
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device
<b>CE</b>	European conformity
<b>REF</b>	Catalogue number
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

**(۵) بررسی ویژگی-آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)**

ویژگی این آزمایش به کمک اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مندرج در جدول زیر به نمونه‌های سرم، ارزیابی شده است. واکنش متقاطع با اندازه-گیری نسبت بین مقدار ماده اضافه شده به مقدار FSH مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، بررسی شده است. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده  $10 \pm 10\%$  درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Analyte	Cross Reactivity	Concentration
hLH	<0.0001	1000 ng/mL
hCG	<0.0001	1000 ng/mL
TSH	<0.0001	1000 ng/mL

**(۶) بررسی حساسیت (Sensitivity)**

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با  $0.2 \text{ mIU/mL}$  می‌باشد.

$$\text{LOD} = \text{LOB} + 1.645 \text{ SD}_s$$

$$\text{LOB} = \text{Mean}_b + 1.645 \text{ SD}_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

**(۷) بررسی اثر هوک (Hook Effect)**

غلظت FSH تا  $2400 \text{ mIU/mL}$  بررسی گردید و اثر هوک مشاهده نشد.

**(۸) بررسی پایداری (Stability)**

**Accelerated Stability Test:** بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.  
**In Use Stability Test:** بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.  
**Shelf Stability Test:** بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد. مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

**پارامترهای کنترل کیفی**
**(۱) بررسی دقت-آزمون دقت درون‌دور (Within-Run)**

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش  $CV < 10\%$  است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean FSH (mIU/mL)	6.81	42.11	79.33
SD (mIU/mL)	0.34	1.98	3.31
CV (%)	5	4.7	4.2

**(۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین‌دور (Between-Run)**

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش  $CV < 10\%$  است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean FSH (mIU/mL)	6.13	35.04	81.11
SD (mIU/mL)	0.35	1.78	3.49
CV (%)	5.7	5.1	4.3

**(۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)**

در این تست به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به عنوان یک نمونه، غلظت FSH در آن سنجش گردید. معیار پذیرش در این آزمایش،  $\text{Bias} < 10\%$  درصد نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (mIU/mL)	Added (mIU/mL)	Exp. (mIU/mL)	Obs. (mIU/mL)	% Rec.
1	12.5	22.7	17.6	17.2	97.7
2	16.8	38.2	27.5	27.8	101.1
3	65.5	19.9	42.7	42.1	98.6

**(۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)**

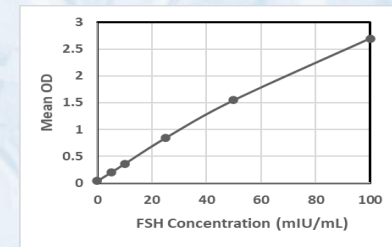
در این تست غلظت FSH در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش  $\text{Bias} < 10\%$  است.

No.	Sample (mIU/mL)	Bias %			
		1/2	1/4	1/8	1/16
1	8.4	-1.8	1.3	-2.2	-1.1
2	17.1	2.4	-1.4	-0.9	-2.7
3	43.3	-2.6	2.2	-1.4	-2.3

(۷) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش به چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

(۸) مقدار جذب نوری را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (mIU/mL)
Cal. A	A1	0.037	0.036	0
	B1	0.036		
Cal. B	C1	0.191	0.195	5
	D1	0.200		
Cal. C	E1	0.359	0.356	10
	F1	0.353		
Cal. D	G1	0.840	0.840	25
	H1	0.841		
Cal. E	A2	1.552	1.545	50
	B2	1.539		
Cal. F	C2	2.718	2.698	100
	D2	2.678		


**مقادیر مورد انتظار برای تست FSH به روش الایزا**

شرکت تولید کننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این آزمایش را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر باید برای آنالیت مورد نظر توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

Reference Intervals (mIU/mL)	
Follicular Phase (Females)	3 – 12
Midcycle Peak (Females)	8 – 22
Luteal Phase (Females)	2 – 12
Postmenopausal (Females)	35 – 151
Males	1 – 14

**References:**

- McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
- Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
- Tietz. Reference information for the clinical laboratory. Hn Textbook of clinical chemistry. Burtis, CA, Ashwood, RA, WB, Saunders. Philadelphia; 1999.

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.