دیاپلاس

DIAPLUS

DiaPlus

کیت ۹۶ تستی اندازه‌گیری FSH به روش الایزا

Brochure Rev: A0 (1401/06/08)

REF 0344-96

اهمیت بالینی

هورمون محرک فولیکول (FSH) یک گلیکوپروتئین با جرم مولکولی تقریبی ۳۵۵۰۰ دالتون می‌باشد که از دو زیر واحد α و β است. مسئول فعالیت بیولوژیکی هورمون، زیرواحد β می‌باشد. این هورمون تحت تاثیر هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) از هیپوفیز قدامی ترشح می‌شود. در مردان، FSH با تاثیر بر سلول‌های سرتولی سنتز اینهیبین را تحریک می‌کند، اینهیبین با مهار ترشح FSH و پروتئین متصل‌شونده به آندروژن به‌طور غیر مستقیم اسپرم زایی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در زنان، FSH با تاثیر بر سلول‌های گرانولوزای تخمدان نقش مهمی در تخمک‌گذاری و چرخه قاعدگی دارد. مقدار این هورمون در اختلالاتی مانند سندرم ترنر و یائسگی زودرس افزایش یافته و در مواردی مانند سندرم کالمن و نارسایی گنادوتروپین کاهش می‌یابد. حیطه کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی غلظت FSH در سرم انسان می‌باشد.

اصول آزمایش

اساس آزمایش در این کیت الایزای ساندویچ می‌باشد. با مخلوط شدن آنتی‌بادی مونوکلونال بیوتینیله شده، آنتی‌بادی متصل به آنزیم و سرم حاوی آنتی‌ژن، واکنش بین آنتی‌بادی‌ها و آنتی‌ژن سرم، منجر به تشکیل کمپلکسی می‌گردد که به‌دلیل تمایل بالای بیوتین به **استرپتاویدین** تثبیت شده به کف چاهک متصل می‌شود. پس از شستشوی چاهک‌ها، با اضافه کردن محلول سوبسترای آنزیم HRP، رنگ آبی تشکیل شده که با افزودن محلول متوقف‌کننده تبدیل به رنگ زرد می‌گردد. محصول نهایی تولید شده در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. میزان رنگ ایجاد شده و در نتیجه شدت جذب نوری، با غلظت FSH سرم ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت FSH در نمونه‌ها، توسط منحنی استاندارد (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت

۱) کالیبراتورها (Calibrators) ۰/۷۵ میلی‌لیتر:

شامل شش ویال کالیبراتور با غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ mIU/mL.

نکته : کالیبراتورها بر پایه سرم انسانی تهیه شده.

۲) محلول کونژوگه آنزیمی (FSH Enzyme Conjugate) ۱۱ میلی لیتر:

یک ویال شامل محلول آنتی‌بادی نشان‌دار شده با آنزیم و آنتی‌بادی بیوتینیله شده.

۳) پلیت ۹۶ تستی:

یک پلیت حاوی استرپتاویدین تثبیت شده که به‌همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی بسته‌بندی شده است.

۴) محلول شستشو غلیظ (Wash Buffer-50X) ۲۰ میلی‌لیتر:

یک ویال شامل سورفاکتانت محلول شده در بافر فسفات.

۵) محلول سوبسترای A (Substrate A) ۶/۵ میلی‌لیتر:

یک ویال محلول تترا متیل بنزیدین (TMB).

۶) محلول سوبسترای B (Substrate B) ۶/۵ میلی‌لیتر:

یک ویال محلول هیدروژن پراکساید (H_2O_2).

۷) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution) ۱۲ میلی‌لیتر:

یک ویال حاوی محلول متوقف‌کننده واکنش.

۸) سرم کنترل (FSH Control):

ویال(های) حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر سرم کنترل.

۹) برچسب پلیت:

یک ورق.

توجه ۱: کلیه اجزای کیت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود. محلول متوقف‌کننده را می‌توان در دمای اتاق نیز نگهداری کرد.

توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در برگه COA درج شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشد

۱) دستگاه خوانش‌گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).

۲) سمپلر کالیبره.

۳) آب مقطر دیونیزه.

موارد احتیاط در استفاده از کیت

- این کیت برای انجام تست‌های تشخیصی در محیط‌های آزمایشگاهی کاربرد دارد. محتویات کیت منشا سرم انسانی داشته و از نظر عدم وجود HBsAg و آنتی‌بادی‌های ضد HIV1/2 و HCV کنترل شده‌اند، اما از آنجا که هیچ روشی به‌طور صددرصد نمی‌تواند منفی بودن این موارد را تایید نماید، بنابراین لازم است هنگام استفاده از کیت، مراقبت‌های لازم به عمل آورده شود.
- محتویات تعبیه شده در این کیت برای استفاده در همین سری ساخت بوده و از استفاده مشترک با سایر سری ساخت‌ها خودداری فرمایید.
- برای دریافت نتایج بهتر و دقیق‌تر فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ چاهک‌ها رعایت شود. این فاصله زمانی نباید به گونه ای باشد که منجر به اثر دریفت (drift) گردد. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل این نکته حائز اهمیت است. دقت نمایید محلول‌ها نزدیک به ته چاهک ریخته شوند.
- شستشوی نامناسب می‌تواند باعث بوجود آمدن نتایج اشتباه در آزمایش شود.
- کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از استفاده از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است خودداری نمایید.

جمع آوری و تهیه نمونه ها

- نمونه مورد استفاده در این آزمایش سرم می‌باشد که از خون سیاهرگی تهیه شده و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا می‌گردد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
- نگهداری سرم باید در لوله‌های در بسته انجام شود. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری می‌باشند و در صورت استفاده برای مدت زمان طولانی‌تر (حداکثر تا ۳۰ روز) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.
- 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.

آماده‌سازی محلول‌ها

محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را با ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید. محلول آماده شده را 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 کنید.

محلول سوبسترا: محلول‌های سوبسترا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول سوبسترا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول سوبسترا B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول سوبسترا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

مراحل انجام تست

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کلیه ویال‌های کالیبراتور، نمونه و کنترل را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت نمایید.

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را جدا نموده و چاهک‌های باقی مانده را به همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده، درب آن را ببندید و در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌های بیمار و کنترل را در داخل چاهک‌های مورد نظر بریزید. پیشنهاد می‌شود از هر نمونه، کالیبراتور و یا کنترل به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود و از میانگین جذب نوری آنها استفاده شود.

توجه: چاهک اول به‌عنوان بلانک در نظر گرفته شود. در این چاهک، نمونه، کنترل و یا کالیبراتور ریخته نشود. بقیه مراحل همانند سایر چاهک‌ها می باشد.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی به تمامی چاهک‌ها اضافه نمایید. پلیت را ۳۰-۲۰ ثانیه به‌آرامی روی سطح میز تکان دهید.

۴) پلیت را به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک‌ها را در روش دستی با وارونه کردن پلیت و در روش دستگاهی با آسپیره کردن کاملاً تخلیه نمایید.

۶) چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده‌سازی محلول‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

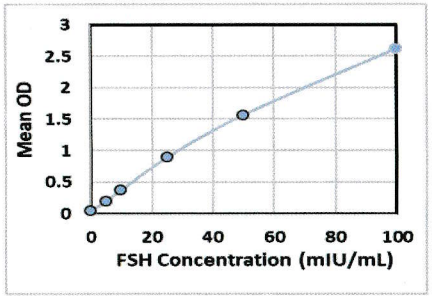
۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا آماده‌شده (به بخش آماده-سازی محلول‌ها مراجعه شود) به چاهک‌ها اضافه نمایید و با برچسب پلیت بپوشانید. سپس پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری فرمایید.

توجه: در صورتی که بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به‌دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول سوبسترا را به‌مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۸) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به چاهک‌ها اضافه نموده و به‌مدت ۲۰-۱۵ ثانیه به‌آرامی تکان دهید.

۹) جذب نوری چاهک‌ها را در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر با روش Point to Point کمتر از ۱۵ دقیقه بخوانید. از طول‌موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ استفاده نمایید.

Calibrators	Well Number	Abs.	Mean Abs	Conc. (mIU/mL)
Cal. A	A1	0.041	0.04	0
	B1	0.039		
Cal. B	C1	0.188	0.190	5
	D1	0.193		
Cal. C	E1	0.351	0.371	10
	F1	0.392		
Cal. D	G1	0.891	0.886	25
	H1	0.882		
Cal. E	A2	1.581	1.561	50
	B2	1.542		
Cal. F	C2	2.615	2.612	100
	D2	2.610		



نکته : جذب نوری به‌دست آمده از کالیبراتورها و همچنین منحنی مربوطه فقط به‌عنوان مثال ذکر شده و در هر آزمایشگاهی در هر مرتبه آزمایش باید منحنی جدیدی ترسیم گردد.

مقادیر مورد انتظار

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به‌قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر برای آنالیت مورد نظر باید توسط آزمایشگاه مصرف‌کننده 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

پارامترهای کنترل کیفی

Intra – Assay

دقت‌داخلی با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری بررسی گردید. 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	22.3	71.2
SD (mIU/mL)	0.34	1.17	2.99
CV (%)	5.5	5.2	4.1

Inter – Assay

دقت بین‌تستی با ارزیابی نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با غلظت‌های متفاوت در چهار نوبت کاری (هر نوبت پنج بار تکرار) بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean FSH (mIU/mL)	13.27	27.28	65.12
SD (mIU/mL)	0.85	1.54	2.84
CV (%)	6.4	5.6	4.3

Recovery

در این تست دو نمونه سرم به‌نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به‌عنوان یک نمونه، مقدار FSH در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش Bias<10% است.

No.	Sample (mIU/mL)	Added (mIU/mL)	Exp. (mIU/mL)	Obs. (mIU/mL)	% Rec.
1	7.98	21.29	14.63	15.01	102.5
2	20.11	46.91	33.51	33.29	99.3
3	39.11	13.01	26.06	26.28	100.8

Linearity

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

No	Sample (mIU/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	6.12	-1.2	2.2	1.3	-1.1
2	35.18	3.9	-2.4	-1.8	2.4
3	68.91	3.1	-2.7	3.3	1.9

Cross Reactivity

اختصاصیت این آزمایش با اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مداخله‌گر به سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه گیری نسبت بین دوز ماده مداخله‌گر به دوز FSH مورد نیاز برای همان مقدار جذب ارزیابی شد.

Sensitivity

بر اساس جمع میانگین جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت ۰/۲ mIU/mL می‌باشد.

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

Hook Effect

غلظت FSH تا ۲۴۰۰ mIU/mL بررسی گردید و اثر هوک مشاهده نشد.

منابع

1. Odell, W.D., Parlow, A.F., et al, J Clin Invest **47,** 2551. (1981)

2. Saxema, B.B., Demura, H.M., et al, *J Clin Endocrinol Metab.* **28,** 591. (1968)

3. Wennink JM, Delemarre-van de Waal HA, Schoemaker R, Schoemaker H, Schoemaker J. Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone secretion patterns in girls throughout puberty measured using highly sensitive immunoradiometric assays. *Clin Endocrinol* (Oxf). **33,** 333–344. (1990)

4. Winter JS, Faiman C. The development of cyclic pituitary-gonadal function in adolescent females. *J Clin Endocrinol Metab.* **37,** 714–718. (1973)

5. Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology and pathophysiology. *Endocr Rev.* **18,** 739–773. (1997)

6. Vitt UA, Kloosterboer HJ, Rose UM, Mulders JW, Kiesel PS, Bete S, Nayudu PL. Isoforms of human recombinant follicle-stimulating hormone: comparison of effects on murine follicle development in vitro. *Biol Reprod.* **59,** 854–861. (1998)

7. Layman LC, Lee EJ, Peak DB, Namnoum AB, Vu KV, van Lingen BL, Gray MR, McDonough PG, Reindollar RH, Jameson JL. Delayed puberty and hypogonadism caused by mutations in the follicle-stimulating hormone ß subunit gene. *N Engl J Med.* **337,** 607–611. (1997)

8. Robertson DR. Circulating half-lives of follicle stimulating hormones and luteinizing hormone in pituitary extracts and isoform fractions of ovariectomized and intact ewes. *Endocrinology* **129,** 1805–1813. (1991)

9. Wide L Electrophoretic and gel chromatographic analyses of follicle stimulating hormone in human serum. *Ups J Med Sci.* **86,** 249–258. (1981)

10. Berger P, Bidart JM, Delves PS, Dirnhofer S, Hoermann R, Isaacs N, Jackson A, Klonisch T, Lapthorn A, Lund T, Mann K, Roitt I, Schwarz S, Wick G Immunochemical mapping of gonadotropins. *Mol Cell Endocrinol* **125**,33–43. (1996)

در صورت بروز هرگونه مشکل با بخش پشتیبانی شرکت تینا پژوهان آروین تماس حاصل فرمایید.

IVD

DIAPLUS
شرکت تینا پژوهان اروین
سهروردی شمالی ، پایین تر از آپادانا،
کوچه فیروزه، پلاک ۳ واحد ۱ و ۲
تلفن: ۰۲۱-۴۱۷۹۶۰۰۰