

مقدمه:

ساختمان و متابولیسم: هورمونهای گلیکو پروتئینی مترشحه از هیپوفیز از دو زنجیره پپتیدی تشکیل شده اند α -subunit که از 89 اسید آمینه تشکیل شده و ساختمانی مشابه GH, TSH, LH دارد و β -subunit مسئول فعالیت ایمنولوژیک داخل سلولیس است. FSH از سلولهای بازوفیل هیپوفیز قدامی ترشح می شود. ترشح بالا و پائین این هورمون در حقیقت بستگی به تیتراستروئیدهای در گردش با مکانیسم فیدبک منفی دارد. فعالیت بیولوژیک FSH در زنان، القاء رشد و بلوغ فولیکول گراف می باشد. در زمان پرئود FSH یک الگوی سیکلیک را طی می کند که بسته به تیتراستروئیدول و پروژسترون است. مدت کوتاهی قبل از تخمک گذاری یک افزایش قابل توجه FSH وجود دارد که برای ردیابی مراحل پرئود و تشخیص نقص کارکرد هیپوفیز روش تشخیصی مناسبی است. در مردان پروسه سیکلیک نیست و توسط اسپرماتوژنز تنظیم میشود، در زنان در دوران نزدیک منوپوز افزایش تیتراستروئید موجود است. این هورمون گنادو تروپیک هیپوفیز قدامی با وزن مولکولی 30000 دالتون شامل 15-30% کربونیدرات می باشد که شامل فروکتوز، مانوز، گالاکتوز، گلوکز آمین و اسید سیالیک می باشد. α -Subunit ها در آمینو اسیدها متفاوتند. α -Subunit ایزوله شده فعالیت بیولوژیکی را سبب می شود و β -Subunit ایزوله ممکن است فعالیت بیولوژیکی کمی داشته باشد اما زمانی که این دو با هم ترکیب میشوند فعالیت به حد اکثر می رسد. حضور α و β برای پاسخ بیولوژیکی حائز اهمیت است. آنتی سرم اختصاصی برای β -Subunit اساس روش های ایمنولوژیک را رهبری می کند.

معرفی آزمایش و کاربرد بالینی:

در سندرم ترنر (Turner) برداشت تخمدانها و در مردان برداشت بیضه ها و Agenesis آنورکیسم (فقدان بیضه) و بلوغ دیررس افزایش FSH دیده می شود. در حاملگی، نقص هیپوتالاموس، PCOD، تخمدان سازنده کیست، هموکروماتوز و آنتی داسی شکل افزایش FSH دیده می شود. در خانم های یائسه به علت فقدان اثر مهاری هورمونهای استروئیدی مترشحه از تخمدان مقدار FSH به صورت قابل ملاحظه ای افزایش می یابد. FSH اسپرماتوژنز را در مردان تحریک می کند. در اطفال تا قبل از سن بلوغ میزان FSH پائین می باشد. سنجش FSH در خانمها جهت بررسی و تشخیص عادت ماهیانه، آمنوره اولیه و ثانویه، هیرسوتیسم و ویریلیسم به کار می رود ضمناً FSH شاخص مناسبی برای بررسی آغاز یائسگی در خانم هاست. سنجش FSH در آقایان در موارد ناباروری، ژنیکوماستیا، هیپوگنادیسم و برخی تومورها حائز اهمیت می باشد، در کودکان سنجش FSH برای بررسی بلوغ جنسی زودرس و یا تاخیری بکار برده می شود.

محدوده طبیعی:

مقادیر نرمال FSH در سرم افراد طبیعی که توسط تست های مکرر به روش الایزا بدست آمده در بانوان باردار بسته به هفته بارداری به شرح زیر می باشد ولی پیشنهاد می گردد تا هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد:

مIu/ml یا Iu/L	زنان
9.9-1.4	فاز فولیکولار
7.2-1.1	فاز لوتئال
17.2-6.7	پیک تخمک گذاری
100.6-19.2	پس از یائسگی
15.4-1.42	مردان زیر 60 سال
4-0	قبل از بلوغ
12-4.3	حین بلوغ (11-15 سال)

اساس آزمایش:

اساس این کیت به روش ساندریچ الایزا می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادی منوکلونال بر علیه یک واحد آنتی ژنیک FSH، Coat میشوند. نمونه بیمارار با آنتی بادی Coat شده در چاهکها مجاور می شود، سپس آنتی بادی ثانویه متصل به آنزیم HRP به چاهکها اضافه می شود که باعث ایجاد یک کمپلکس ایمنی می شود که نشانگر غلظت FSH در نمونه ها می باشد. در ادامه پس از شستشو، محلول رنگزا که حاوی H₂O₂ و کروموزن است به داخل چاهکها ریخته میشود و تولید رنگ آبی می کند که رنگ آبی تولید شده متناسب با کمپلکس ایمنی ایجاد شده در چاهکها می باشد. با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل میشود که بهترین جذب نوری را در طول موج 450 نانومتر دارد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

سرم غیر همولیز و غیر لیپمیک و غیر ایکتریک که تا 8 روز در دمای اتاق و 2 هفته در یخچال و به مدت بیشتر در 20- پایدار است. بخاطر سیکلیک بودن و تغییرات پرئودیک گونادوتروپین، بهتر است در چند سری اندازه گیری انجام شود.

واکنش تداخلی:

سایتمدین، کلومیفن فلوئودوپا باعث افزایش و کورتیکواستروئیدها، مگستروول، فنوتیازین ها، استانوزولول و قرص ضد بارداری باعث کاهش در نتیجه آزمایش می شوند.

محتویات کیت:

- یک عدد پلیت حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد FSH (Anti -FSH Coated Plate) دارای 96 چاهک.
- سری استاندارد (Standard Set): 6 ویال استاندارد دارای غلظت های mIu/ml صفر، 10، 20، 50، 100 که هر ویال محتوی 1 میلی لیتر می باشد.
- سرم کنترل (Control Serum): یک ویال حاوی 1 میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص نوشته شده روی برجسب ویال
- محلول رقیق کننده نمونه ها (Sample Diluent): یک ویال حاوی 1 میلی لیتر برای رقیق کردن نمونه هائی که غلظت بالاتری از بالاترین استاندارد کیت را دارا می باشند.
- محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate): یک ویال حاوی 12 میلی لیتر محلول حاوی FSH کنژوگه شده با HRP.

- 6- محلول شستشو (Washing Solution) : یک ویال حاوی 40 میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (X 25) که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف مقدار لازم از محلول شستشوی غلیظ را به نسبت 1/25 با آب مقطر رقیق کنید.
- 7- محلول رنگزا (Chromogen Substrate) : یک ویال حاوی 12 میلی لیتر و آماده برای مصرف.
- 8- محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال حاوی 12 میلی لیتر.
- 9- بر چسب مخصوص پلیت (Card Board Sealer)

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشد:

- 1- دستگاه خوانش الیزا (Eliza Reader) دارای فیلتر 450 نانومتر و در صورت امکان 630 به عنوان فیلتر رفرانس.
- 2- سمپلر های 50 و 100 میکرولیتر دقیق
- 3- آب مقطر

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

- 1- محتویات این کیت برای مصرف در همین کیت می باشد .
- 2- از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جدا خودداری نمایید .
- 3- کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HIV, HCV, HBs AG کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند . جهت احتیاط بهتر است هر کاربری که با کیت کار می کند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزد

توضیحات عمومی:

- 1- قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق رسانده و به خوبی تکان دهید تا کاملاً یکنواخت شوند.
- 2- بهتر است به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند .
- 3- از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید .
- 4- پس از افزودن محلول متوقف کننده ، جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .
- 5- برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند .
- 6- از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب ، زمان انکو باسیون مناسب می باشد ، بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و در محلولهای مورد نیاز را باز کنید ، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیقتری میشود.
- 7- بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه ها پیش از 5 دقیقه به طول نیانجامد .

مراحل انجام آزمایش :

- 1- تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب نموده و باقی چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .
- 2- 50 میکرولیتر از هر استاندارد ، سرم کنترل و نمونه را به داخل هر چاهک بریزید ، سپس 100 میکرولیتر محلول آنزیم کونژوگه (Enzyme Conjugate) به هر چاهک اضافه نمائید. پلیت را به آرامی به مدت 15 ثانیه تکان دهید تا محتویات آن بخوبی مخلوط شوند ، پیشنهاد می گردد که از استانداردها و نمونه ها به صورت داپلیکیت استفاده شود بدین معنی که هر استاندارد و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید سپس چاهکها را به مدت 60 دقیقه در درجه حرارت اتاق (22-28 درجه سانتیگراد) انکوبه نمائید .
- 3- محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را 5 بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشوئید (برای شستشو می توان از سمپلر 8 کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد). در هر دفعه شستشو حدود 300 میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهکها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی محلول شستشو خارج شوند.
- 4- 100 میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen – Substrate) به هر چاهک اضافه نمائید و چاهکها را به مدت 15 دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمائید .
- 5- با اضافه کردن 100 میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمائید . برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الیزا ریدر با فیلتر 450 nm استفاده نمائید . (توصیه می شود از فیلتر 630 nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد.)

شرایط نگهداری فرآورده تشخیصی:

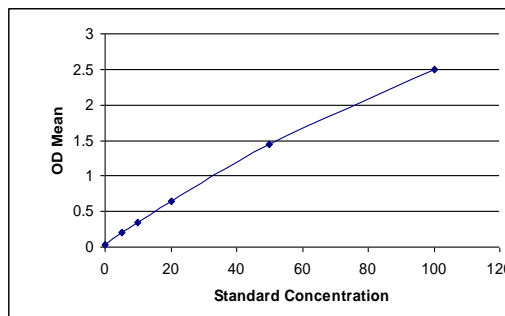
- 1- دمایی نگهداری کیت بین 2-8 C' می باشد و بهتر است که در 4C' نگهداری شود .
- 2- با توجه به انجام تست های Full Term , accelerate این کیت در صورت رعایت موارد نگهداری صحیح تا 12 ماه پایدار می باشد و در این مدت کیت حاضر بالای 90 درصد کارایی اولیه را داراست. با توجه به آزمایشات انجام شده در صورت باز نمودن کیت یک ماه پایدار می باشد .
- 3- چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمائید .
- 4- **توجه :** در صورت باز شدن درب کیت و محلول ها تازمانی که آلودگی میکروبی و قارچی رخ ندهد کیت پایدار خواهند بود.

محاسبه نتایج :

- 1- جذب نوری استاندارد ها و نمونه ها را به کمک دستگاه Eliza Reader در طول موج 450nm و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس 630nm بخوانید.

- 2- با استفاده از میانگین جذب نوری استاندارد ها و غلظت معلوم آنها نموداری Point To Point رسم کنید ، به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آنها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد بدست آورید ، در ادامه نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمائید تا منحنی بدست آید.
- 3- میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن را پیدا کنید ، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمائید بطوریکه این خط کاملا بر محور عمودی عمود باشد و در ادامه از محل تلاقی خط و منحنی ، خطی عمود بر محور افقی وارد کنید ، نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد.

جذب نوری	استانداردها (IU/L)
0.034	0
0.207	5
0.34	10
0.65	20
1.44	50
2.5	100



توجه : جذب های نوری و منحنی مربوط فقط به عنوان نمونه می باشند و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

شاخصهای اجرایی:

- 1- حداقل مقدار قابل اندازه گیری :
بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت FSH قابل تشخیص در این کیت 1.0 IU/L می باشد .
- 2- دقت آزمایش :
آزمایشهای اینترا-اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و اینترا-اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایشهای مختلف) با استفاده از 4 استاندارد با غلظتهای مختلف FSH انجام گردید که در جدول 1 و 2 آمده است .

جدول شماره 1 (اینترا-اسی)

نمونه	تعداد دفعات تکرار	میانگین IU/L	SD IU/L	CV%
1	12	0/5	0/042	6/5
2	12	5	0/17	5/3
3	12	10	0/32	5/4
4	12	40	0/85	3/9

جدول شماره 2 (اینترا-اسی)

نمونه	تعداد دفعات تکرار	میانگین IU/L	SD IU/L	CV%
1	5	0/5	0/049	9/4
2	5	5	0/16	5/2
3	5	10	0/39	6/6
4	5	40	0/94	4/5

هر سری آزمایش بصورت Duplicate انجام شده است .

- 3- خطی بودن آزمایش :
به کمک استاندارد صفر رفتهای متوالی 4 نمونه سرم با غلظت مشخص از FSH تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت محاسبه شد که در جدول زیر نتایج آن آورده شده است .
جدول خطی بودن :

نمونه	مقدار FSH موجود در سرم رقیق نشده (IU/L)	ریکوری (%)		
		رقت 25%	رقت 50%	رقت 75%
1	10	98	96	100
2	100	100	93	96
3	400	95	96	91

- 4- ریکوری آزمایش :
مقادیر معلومی از FSH به 4 سرم با غلظتهای مشخص FSH افزوده شد و ریکوری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول صفحه بعد آمده است .

جدول ریکواری :

ریکواری (%)	مقدار بدست آمده (IU/L)	مقدار مورد انتظار (IU/L)	مقدار افزوده شده FSH (IU/L)	مقدار FSH موجود در سرم (IU/L)	نمونه
96.5	19.3	20	25	15	1
97.6	105	107.5	200	15	1
101	414	407.5	800	15	1
92	50.3	54.5	25	84	2
93.6	133	142	200	84	2
97.5	431	442	800	84	2
96	144	150	25	275	3
88.8	211	237.5	200	275	3
101	545	537.5	800	275	3
94.8	320	337.5	25	650	4
103	440	425	200	650	4
96.8	702	725	800	650	4

5- اختصاصیت آزمایش :

اختصاصیت این آزمایش به کمک سرمهایی با غلظتهای مختلف human TSH, human FSH, human LH جهت بررسی واکنشهای متقاطع با HCG بررسی شد که نتایج آن در جدول زیر آمده است .

جدول اختصاصیت (واکنش متقاطع) :

غلظت ظاهری HCG (IU/L)	غلظت	آنالیت
<1	200000	HCG(IU/L)
<1	100000	
<1	1000	
<1	500	hLH(IU/L)
<1	100	
<1	50	
<1	500	hTSH(mIU/L)
<1	100	
<1	50	

6- اثرهوک (Hook Effect)

آزمایش hFSH جهت سرمهایی با غلظت بسیار بالا از این آنالیت (2500 IU/L) صورت گرفت که پدیده هوک مشاهده نشد .

References

Wide, L., Loraine, Ed. J. A., Bell, E. T. 1976. Human pituitary gonadotropins: hormone assays and their clinical application, Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York, 4 ed. pp 78-140.

Adress :

No:1161 , Bid Avenue , Payetakht , Industrial zone , Tehran , Iran

Tel : +98 21 66 56 91 84 - 66 59 37 41 Fax : +98 21 66 56 14 28

Email : info@biokarpira.com

www.biokarpira.com



043 ISO 9001-2008 13485