

## کیت سنجش FSH به روش الایزا

### مقدمه :

FSH هورمونی گلیکوپروتئینی است که از سلولهای بازوفیلیک بخش قدامی غده هیپوفیز ترشح می شود. ترشح FSH توسط هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRh) تحریک می گردد. هورمونهای استروئیدی گنادها مانند پروژسترون، استروژن و آندروژنها دارای اثرات فیدبک مثبت و منفی در ترشح FSH هستند. ترشح FSH دارای یک الگوی نوسانی میباشد که در خانمها نسبت به آقایان با وضوح بیشتری قابل مشاهده است. در خانمها در دوره عادت ماهانه غلظت FSH دارای تغییراتی است بدین ترتیب که در آغاز عادت ماهانه (فاز فولیکولار) FSH با اثر بر فولیکولهای تخمدان باعث بلوغ آنها می گردد و با افزایش FSH در اواسط دوره عادت ماهانه عمل تخمک گذاری (اوولاسیون) صورت می پذیرد. غلظت FSH در اوایل عادت ماهانه (فاز فولیکولار) بصورت خفیفی بالاتر از غلظت آن در اواخر دوره (فاز لوتال) می باشد. در خانمهای یائسه به علت فقدان اثر مهاری هورمونهای استروئیدی مترشحه از تخمدان مقدار FSH بصورت قابل ملاحظه ای افزایش می یابد. در آقایان هورمون FSH باعث تحریک عمل اسپرماتوژنز می گردد. در اطفال تا قبل از سن بلوغ میزان غلظت FSH پایین می باشد. سنجش FSH در خانمها جهت بررسی و تشخیص اختلالات عادت ماهانه، آمنوره اولیه و ثانویه، هیرسوتیزم و ویریلیزم به کار می رود ضمناً FSH شاخص مناسبی جهت بررسی آغاز یائسگی در خانمهاست. سنجش FSH در آقایان در موارد ناباروری، هیپوگنادیسم، ژنیکوماستی و برخی تومورها حائز اهمیت می باشد. در کودکان سنجش FSH جهت بررسی بلوغ جنسی زودرس و یا تاخیری بکار برده می شود. کیت حاضر قابلیت اندازه گیری و تیتراسیون هورمون FSH را با اختصاصیت و حساسیت بسیار بالا دارا می باشد.

### اساس آزمایش :

اساس این کیت به روش ساندویچ و با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادیهای علیه یک شاخص آنتی ژنیک زیر واحد بتای مولکول FSH پوشش داده می شوند (Coating). نمونه بیماران با آنتی بادی پوشش داده شده در ته چاهکها مجاور می شود، سپس آنتی بادی ثانویه ضد FSH متصل به آنزیم HRP به چاهکها اضافه می شود. مقدار کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها با غلظت FSH در نمونه ها متناسب است. پس از شستشو محلول رنگزا که حاوی هیدروژن پراکسید (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) و کروموزن است، داخل چاهکها ریخته می شود که رنگ آبی پدید آمده با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها متناسب است، با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد.

### محتویات کیت :

- ۱) پلیت ۹۶ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد FSH (Anti – FSH Coated Plate).
- ۲) محلول آنزیم کونژوگه (FSH Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف).
- ۳) سری استانداردها (Standards Set) : شامل ۶ ویال استاندارد با غلظتهای صفر، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ IU/L از FSH کالیبره شده در مقابل استاندارد WHO 1<sup>st</sup> IRP 83/575 (استاندارد صفر حاوی ۲ میلی لیتر و سایر استانداردها حاوی ۱ میلی لیتر می باشند).
- ۴) سرم کنترل : یک ویال حاوی ۱ میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال.
- ۵) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen - Substrate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف).
- ۶) محلول شستشو : یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۲۰X). جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید.
- ۷) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر اسید کلریدریک ۱ نرمال.
- ۸) برچسب مخصوص پلیت.

### مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند :

- ۱) دستگاه الایزایدری در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس).
- ۲) سمپلر های ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر دقیق.
- ۳) آب مقطر.

### نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

- ۱) محتویات این کیت برای مصرف در همین کیت طراحی شده است.
- ۲) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختههای مختلف جداً خودداری نمایید.
- ۳) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HbsAg و آنتی بادیهای ضد HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند، جهت احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند.

## شرایط نگهداری :

- کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید .
- چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید .
- پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد .
- محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۸ - ۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد .

## جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم را می توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود ، نمونه می تواند برای مدت دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود ولی برای نگهداری بیش از مدت دو روز باید از دمای ۲۰- درجه سانتی گراد استفاده گردد. در ضمن باید از Freeze - thaw نمودن نمونه پرهیز شود .

## توضیحات عمومی :

- قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق برسانید .
- بهتر است به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند .
- از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید .
- پس از افزودن محلول متوقف کننده جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .
- برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند .
- در هنگام سمپلینگ تمام محلولها و نمونه ها را وسط چاهکها بریزید .
- از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب زمان انکوباسیون مناسب می باشد، بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب محلولهای مورد نیاز را باز کنید ، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیقتر می شود .
- به دلیل مشابه در بند ۷ بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه ها بیش از ۵ دقیقه بطول نیانجامد .

## مراحل انجام آزمایش :

- تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب نموده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .
- ۵۰ میکرولیتر از هر استاندارد ، سرم کنترل و نمونه را داخل هر چاهک بریزید ، پیشنهاد می گردد که از استانداردها و نمونه ها بصورت 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 .
- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme conjugate) را به هر چاهک اضافه نموده و پلیت را به آرامی به مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات آن به خوبی مخلوط شوند .
- درب چاهکها را با برسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۸ - ۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید .
- محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید ، (برای شستشو می توان از سمپلر ۸ 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 ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو چاهکها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند) .
- ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen - substrate) به هر چاهک اضافه نمایید .
- چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید .
- با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (stop solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید . برای سنجش جذب نوری از دستگاه الایزایدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نمایید ( توصیه می شود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر فرانس استفاده گردد) .

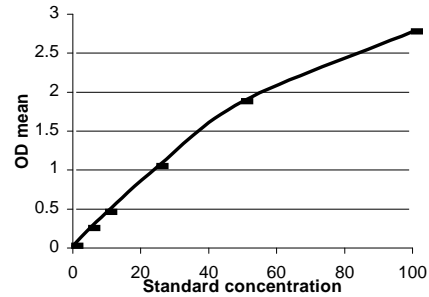
## محاسبه نتایج :

- از هر دستگاه الایزایدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm میتوان استفاده نمود .
- ( جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزایدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر فرانس ۶۳۰ nm) بخوانید .

۲) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها 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، سپس نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی بدست آید.

۳) 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 نمایید بطوریکه این خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و بعد 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.

استانداردها (IU/L)	جذب نوری
۰	۰/۰۲۸
۵	۰/۳۵۵
۱۰	۰/۴۶۰
۲۵	۱/۰۵۰
۵۰	۱/۸۸۲
۱۰۰	۲/۷۷۸



**توجه:** جذبهای نوری و منحنی مربوطه فقط به عنوان نمونه می باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

### مقادیر مورد انتظار:

مقادیر نرمال FSH در سرم افراد طبیعی که توسط تستهای مکرر به روش الایزا بدست آمده به قرار زیر می باشد ولی پیشنهاد می گردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد:

محدوده طبیعی (IU/L)	میانگین محدوده طبیعی (IU/L)	
۱/۵ - ۹/۷	۵/۲	خانمهای نرمال قبل از یائسگی:
۸ - ۲۰	۱۴	فاز فولیکولار اواسط عادت ماهانه
۱/۱ - ۷/۲	۴/۱	فاز لوتئال
۳۰ - ۱۱۰	۷۰	خانمهای یائسه
۲ - ۱۰	۶	مردان زیر ۶۰ سال

### شاخصهای اجرایی:

#### ۱) 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 ۱ IU/L می باشد.

#### ۲) 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 آزمایشات مختلف) با استفاده از ۳ سرم با غلظتهای مختلف hFSH انجام گردید که در جداول ۱ و ۲ آمده است:

### جدول شماره ۱ (اینترا-اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (IU/L)	SD	CV (%)
۱	۳۴	۷	۰/۲	۲/۹
۲	۳۴	۱۹	۰/۸	۴/۲
۳	۳۴	۶۲	۴/۱	۶/۶

### جدول شماره ۲ (اینتر-اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (IU/L)	SD	CV (%)
۱	۱۰	۷/۹	۰/۳	۳/۸
۲	۱۰	۱۸/۲	۱/۰	۵/۵
۳	۱۰	۶۱	۵/۸	۹/۵

هر سری آزمایش بصورت Duplicate انجام شده است .

### ۳) ریکاوری آزمایش :

مقادیر معلومی از hFSH به ۴ سرم با غلظتهای مشخص hFSH افزوده شد و ریکاوری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول زیر آمده است :

### جدول ریکاوری :

نمونه	مقدار hFSH موجود در سرم (IU/L)	مقدار افزوده شده hFSH (IU/L)	مقدار مورد انتظار (IU/L)	مقدار بدست آمده (IU/L)	ریکاوری (%)
۱	۲	۵	۳/۵	۳/۶	۱۰۳
۱	۲	۲۵	۱۳/۵	۱۲/۵	۹۳
۱	۲	۱۰۰	۵۶	۵۸	۱۰۴
۲	۷	۵	۶	۶/۵	۱۰۸
۲	۷	۲۵	۱۶	۱۵	۹۴
۲	۷	۱۰۰	۵۳/۵	۵۱	۹۵
۳	۱۴	۵	۹/۵	۹	۹۵
۳	۱۴	۲۵	۱۹/۵	۲۱	۱۰۸
۳	۱۴	۱۰۰	۵۷	۵۵	۹۶
۴	۴۵	۵	۲۵	۲۴	۹۶
۴	۴۵	۲۵	۳۵	۳۸	۱۰۹
۴	۴۵	۱۰۰	۷۲/۵	۶۹	۹۵

### خطی بودن آزمایش :

به کمک استاندارد صفر رفتهای متوالی ۴ نمونه سرم با غلظت مشخص از hFSH تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت محاسبه شد که در جدول زیر نتایج آن آورده شده است .

### جدول خطی بودن :

ریکاوری (%)				مقدار hFSH موجود در سرم رقیق نشده (IU/L)	نمونه
رقت ۱/۱۶	رقت ۱/۸	رقت ۱/۴	رقت ۱/۲		
۱۰۰	۹۷	۹۸	۹۷	۲۰	۱
۹۷	۹۹	۱۰۳	۹۶	۳۹	۲
۹۹	۹۷	۱۰۱	۹۵	۴۷	۳
۹۷	۹۶	۹۷	۱۰۰	۸۰	۴

### ( اختصاصیت آزمایش :

اختصاصیت این آزمایش به کمک سرمهایی با غلظتهای مختلف hLH , hTSH و hCG جهت بررسی واکنشهای متقاطع با hFSH بررسی شد که نتایج آن در جدول زیر آمده است :

### جدول اختصاصیت (واکنش متقاطع) :

غلظت ظاهری hFSH (IU/L)	غلظت	آنالیت
< ۱	۵۰۰	hLH (IU/L)
	۲۵۰	
	۱۰۰	
	۵۰	
< ۱	۵۰۰	hTSH (mIU/L)
	۲۵۰	
	۱۰۰	
	۵۰	
< ۱	۲۰۰۰۰۰	hCG (IU/L)
	۱۰۰۰۰۰	
	۱۰۰۰۰	
	۱۰۰۰	

### ( اثر هوک (Hook Effect) :

آزمایش hFSH جهت سرمهایی با غلظت بسیار بالا از این آنالیت (تا ۲۵۰۰ IU/L) صورت گرفت که پدیده هوک مشاهده نشد .

### References :

Wide L. Human pituitary gonadotropins: Hormone assays and their clinical application, pp 87-140 Ed J A Loraine, E T Bell, Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York 1976.

## روش انجام آزمایش FSH بصورت شماتیک

چاهک های کوت شده با آنتی بادی ضد FSH			
محلولها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
استانداردها	۵۰ میکرولیتر	-	-
سرم کنترل	-	۵۰ میکرولیتر	-
نمونه	-	-	۵۰ میکرولیتر
آنزیم کنژوگه	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
<p>پلیت را با ملایمت به مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهکها بخوبی مخلوط شوند و سپس دهانه چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید . برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهک ها را خالی کنید . طبق دستور شستشو ۵ بار چاهک ها را بشویید .</p>			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
<p>۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید .</p>			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
<p>جذب نوری چاهک ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید .</p>			