کیت ایمونو آنزیماتیک (EIA) پادتن علم (۹۶ تستی)

FSH

موارد استفاده:
تعیین کمّی FSH در سرم یا پلاسما

I. مقدمه

هورمون FSH (Follicle Stimulating Hormone) گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ۳۰ kDa ، از دو زنجیره α و ß ساخته شده است که با پیوندهای غیر کووالانسی به هم متصل شده‌اند. برخلاف زنجیره اختصاصی ß که مسئول خصوصیات هورمونی و ایمونولوژیکی FSH است، زنجیره α شباهت ساختمانی زیادی با زنجیره‌های α هورمون‌های HCG, TSH و LH دارد[۱-۳].
FSH توسط سلول‌های لوب قدامی هیپوفیز ترشح می شود. این ترشح به وسیله یک دکاپپتید هیپوتالامیک به نام هورمون آزاد کنندهٔ گونادوتروپین (GnRH) تحریک می‌شود [۴-۵].
در زنان، ترشح FSH وابسته به سیکل ماهیانه است. در ابتدای سیکل، سیستم فیدبک منفی هورمون‌های استروئیدی (پروژسترون و استرادیول) باعث مهار ترشح FSH و تحریک ترشح GnRH می‌شود. سپس در نیمه‌های سیکل بالا رفتن تیتر GnRH ترشح FSH را تحریک می‌کند. FSH با تحریک گیرنده‌های اختصاصی خود بر روی غشای سلولهای گرانولوزای (granulosa) تخمدان‌ها باعث رشد فولیکول‌های تخمدان می‌شود.
در مردان، FSH با تحریک گیرنده‌های اختصاصی خود بر روی سلولهای سرتولی (Sertoli) از طرفی سبب سنتز inhibin و Androgen binding protein و از طرف دیگر به همراه LH و تستوسترون باعث تحریک اسپرماتوژنز می‌شود[۶-۷].
در زنان یائسه به دلیل پائین بودن سطح هورمون‌های استروئیدی، فیدبک منفی این هورمون‌ها غیرفعال است. بنابراین سنتز FSH مستمر و سطح سرمی این هورمون بالا است.
اندازه‌گیری غلظت FSH در سرم یا پلاسما، در تشخیص نارسائی‌های محور هیپوتالاموس – هیپوفیز – گنادها اهمیت دارد و در تشخیص افتراقی بیماری‌هایی که با افزایش یا کاهش آن مرتبط هستند، مفید است[۸-۱۰].

II. اصول اندازه‌گیری

کیت اندازه‌گیری کمّی FSH بر مبنای سنجش واکنش ایمونوآنزیماتیک بر روی فاز جامد طراحی شده است. در این سیستم از دو آنتی بادی مونوکلنال موش که شاخص‌های آنتی ژنیک متمایزی را بر روی مولکول FSH شناسائی می‌کنند، استفاده شده است. ابتدا در حفره‌های پلی استایرن پوشیده شده با آنتی‌بادهای منوکلنال FSH، استانداردها، سرم کنترل ها و نمونه های بیماران ریخته می شود. سپس آنتی‌بادی دوم ضد FSH که به آنزیم پراکسیداز (HRP) متصل شده است به حفره‌ها افزوده می‌شود. در حین انکوباسیون، FSH موجود در نمونه‌ها از طرفی به آنتی‌بادی‌های ضد FSH متصل به پلی استایرن و از طرف دیگر به آنتی‌بادی دوم ضد FSH که به آنزیم پراکسیداز (HRP) متصل شده است وصل میگردد. بعد از انکوباسیون و شستشو افزودن سوبسترای TMB (۳ و ´۳ – ۵ و ´۵ تترامتیل بنزیدین) سبب ایجاد رنگ آبی توسط آنزیم می شود. شدت رنگ ایجاد شده با غلظت FSH موجود در نمونه‌ها نسبت مستقیم دارد.

پس از افزودن محلول متوقف کننده، رنگ‌زائی واکنش آنزیماتیک خاتمه می‌یابد و رنگ آبی ایجاد شده به رنگ زرد تبدیل می‌شود. شدت رنگ با اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. برای تعیین غلظت FSH نمونه‌ها ابتدا منحنی جذب نور استانداردها برحسب غلظت FSH آنها رسم و سپس میزان غلظت FSH نمونه از روی منحنی استاندارد تعیین می‌شود.

III. محتویات کیت:

محلولهای این کیت (Cat.No.P-FSI) برای انجام ۹۶ تست در نظر گرفته شده و تاریخ انقضای هر یک بر روی شیشه آن درج شده است. دمای مناسب برای نگهداری کیت ۸-۲ درجه سانتی‌گراد است.

۱. **پلیت:** پلیت ۹۶ حفره‌ای پوشش داده شده با آنتی‌بادی‌های مونوکلنال ضد FSH موش

۲. **استاندارد صفر:** ۱ ویال ۴ میلی‌لیتری. از استاندارد صفر برای رقیق کردن نمونه‌ها استفاده شود.

۳. **استانداردها:** ۵ ویال ۱/۰ میلی لیتری محلول سرم دار حاوی FSH انسانی. غلظت دقیق FSH استانداردها، که بر مبنای استاندارد سازمان بهداشت جهانی (2nd IRP 78/549) کالیبر شده اند، بر روی برچسب آنها درج شده است.

۴. **کنترل‌های سرمی:** ۲ ویال ۱/۰ میلی لیتری حاوی FSH و سرم انسانی. غلظت‌های دقیق FSH کنترل‌های سرمی بر روی برچسب کنترل‌ها درج شده است.

۵. **ردیاب آنزیمی:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری آنتی‌بادی مونوکلنال ضد FSH متصل به پراکسیدار (HRP) محلول در بافر PBS، حاوی پروتئین و تیمروزال

۶. **محلول شستشوی غلیظ (۲۰X):** یک ویال ۱۲ میلی لیتری PBS-Tween ۲۰ و تیمروزال.

۷. **محلول رنگ زا:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری بافر H_2O_2 و TMB

۸. **محلول متوقف کننده واکنش:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری H_2SO_4 دو نرمال

IV. وسایل مورد نیاز (این وسایل همراه کیت عرضه نمی‌شوند):

۱. دستگاه اسپکتروفتومتر میکروپلیت با دامنه جذب نوری ۳-۰ در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰ .

۲. میکروپیپت قابل تنظیم بر روی ۲۵ و ۱۰۰ میکرولیتروتیپ های یکبار مصرف

۳. آب مقطر یا آب دیونیزه برای رقیق کردن محلول شستشو

V. جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها:

نمونه مناسب برای اندازه‌گیری FSH ، سرم یا پلاسمای هپارینه بیمار است. این نمونه‌ها را یک تا دو هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد می‌توان نگهداری کرد. برای نگهداری نمونه‌ها به مدت طولانی‌تر، سرم یا پلاسمای بیمار را در حجم‌های کم تقسیم و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. بهتر است از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه‌ها اجتناب شود. برای اندازه‌گیری FSH نمونه‌های منجمد شده، ابتدا نمونه را در حرارت اتاق ذوب و سپس با حرکت دست یکنواخت کنید. برای یکنواخت کردن نمونه‌ها از Vortex استفاده نکنید. برای اندازه‌گیری دقیق نمونه هائی که FSH آنها بیش از آخرین استاندارد است، ابتدا نمونه‌ها را با استاندارد صفر رقیق و دوباره اندازه‌گیری کنید. بدیهی است در محاسبه نتایج این نمونه‌ها، ضریب رقت منظور می‌شود.

VI. روش کار:

قبل از شروع کار باید دمای تمامی محلول‌ها به دمای اتاق برسد.

محلول شستشوی غلیظ به نسبت یک به بیست با آب مقطر یا دیونیزه رقیق شود. (یک حجم محلول شستشوی غلیظ به ازاء ۱۹ حجم آب). محلول شستشوی رقیق را می‌توان تا یک هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد نگهداری کرد. درصورت مشاهده کریستال در محلول غلیظ شستشو، ویال را چند دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید تا محلول یکنواخت شود.

۱. *ابتدا ۲۵ میکرولیتر از استانداردها، سرم کنترل‌ها و سرم بیماران را در حفره‌ها بریزید، و به آن ۱۰۰ میکرولیتر کونژوگه ضد FSH اضافه کنید. سپس با تکان دادن پلیت، محتویات حفره‌ها را به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط نمائید.*

۲. *پلیت را یک ساعت در دمای اتاق قرار دهید.*

۳. *حفره ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشوئید.*

۴. *به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای TMB اضافه کنید.*

۵. *پلیت را ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و در محلی تاریک قرار دهید.*

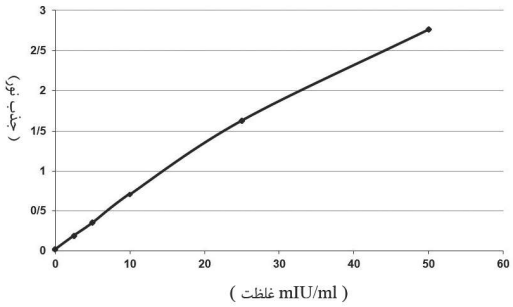
۶. *۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده واکنش در هر حفره بریزید و ۱۰ ثانیه مخلوط کنید. میزان جذب نور حفره‌ها را تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) بخوانید.*

VII. محاسبه نتایج:

پس از تعیین میزان جذب نوری استانداردها و نمونه‌ها و ترسیم منحنی استاندارد، غلظت FSH بیماران را می‌توان محاسبه کرد. در منحنی مذکور که با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (قابل برنامه‌ریزی) و یا به صورت دستی ترسیم می‌شود، محور Y شاخص میزان جذب نور استانداردهای FSH در طول موج ۴۵۰ nm و محور X شاخص غلظت استانداردهای FSH برحسب mIU/ml است. نتایجی که در جدول زیر آمده، فقط مثال است و نباید برای تعیین غلظت نمونه‌ها از آن استفاده شود.

غلظت FSH (mIU/ml)	جذب نور	نمونه
۰/۰	۰/۰۲	استاندارد A
۲/۵	۰/۱۹	استاندارد B
۵/۰	۰/۳۵	استاندارد C
۱۰/۰	۰/۷۱	استاندارد D
۲۵/۰	۱/۶۳	استاندارد E
۵۰/۰	۲/۷۶	استاندارد F
۲۴/۸	۱/۵۳	سرم

برای ترسیم منحنی از غلظت‌های مندرج بر روی ویال استانداردها استفاده کنید.



VIII. مقادیر طبیعی:

در کتاب‌های مرجع، مقادیر طبیعی FSH برای افراد سالم در سرم یا پلاسما به شرح زیر گزارش شده است.

Adult male	۱/۵-۱۲/۴ mIU/ml
Adult female	
-Folicular	۳/۵-۱۲/۵ mIU/ml
-Ovulatory peak	۴/۷-۲۱/۵ mIU/ml
-Luteal	۱/۷-۷/۷ mIU/ml
Postmenopausal	۲۵/۸ ۱۳۴/۸ mIU/ml

توصیه می‌شود هر آزمایشگاه با در نظر گرفتن غلظت سرمی FSH افراد سالم دامنهٔ طبیعی آن را تعیین و از آن برای تفسیر نتایج خود استفاده کند.

IX. ویژگی‌های اختصاصی تست:

۱. حساسیت: به حداقل غلظت FSH که اختلاف جذب نوری آن نسبت به جذب نور استاندارد صفر، معنی‌دار باشد، حساسیت کیت گفته می‌شود. این مقدار برای کیتFSH، ۰/۵ mIU/ml است.

۲. اختصاصی بودن: اختصاصی بودن تست FSH با اندازه گیری غلظت FSH بعد از افزودن مقادیر بالایی از هورمون های LH (۵۰۰ mIU/ml)، TSH (۱۰۰ mIU/ml)، ßHCG (۱۰۰،۰۰۰ mIU/ml) بررسی شده است. نتایج این آزمایشات تداخلی، در جدول زیر نشان داده شده است.

هورمونFSH (mIU/ml)			
نام	غلظت	غلظت اندازه گیری شده	غلظت پیش بینی شده
LH	۵۰۰ mIU/ml	۱۶/۰	۱۴/۹
TSH	۱۰۰ mIU/ml	۱۶/۴	۱۴/۹
ßHCG	۱۰۰،۰۰۰ mIU/ml	۱۵/۴	۱۴/۹

۳. اثر Hook: در کیت EIA پادتن علم برای نمونه‌های رقیق نشده تا غلظت تقریبی ۱۰۰،۰۰۰ mIU/ml اثرHook مشاهده نشده است.

۴. دقت: شاخص دقت کیت با مقایسه تکرارپذیری جواب‌ها به روش میان‌سنجی (Inter-assay) و درون‌سنجی (Intra-assay) تعیین شده است. برای این منظور ۴ نمونه سرم ده بار در یک دوره آزمایش (درون‌سنجی) و یکبار در ده دوره آزمایش متفاوت (میان‌سنجی) تعیین غلظت شده است. نتایج انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات (CV) در جدول زیر آمده است.

جدول شاخص دقت

درون‌سنجی			میان‌سنجی		
٪CV	SD	mIU/ml میانگین	٪CV	SD	mIU/ml میانگین
۱/۸	۰/۱	۷/۲	۶/۰	۰/۴	۷/۳
۴/۹	۱/۳	۲۶/۰	۳/۶	۰/۹	۲۴/۰
۱/۸	۰/۹	۵۱/۴	۲/۰	۱/۰	۵۳/۳
۳/۲	۲/۷	۸۷/۴	۲/۴	۲/۱	۸۴/۶

۵. ریکاوری و رقت: ریکاوری به حالتی اطلاق می‌شود که با افزودن حجم معینی از یک محلول با غلظت بالا، به نمونه رقیق‌تر، افزایش غلظت حاصل شود. برای تعیین ریکاوری، محلولی با غلظت بالای FSH به نمونه سرمی که غلظت پائینی از FSH دارد، افزوده شده است. درصد ریکاوری طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$\frac{\text{غلظت اندازه‌گیری شده (mIU/mI)}}{\text{غلظت پیش‌بینی شده (mIU/mI)}} \times ۱۰۰$$

دامنه درصد ریکاوری بدست آمده از ٪۱۰۰/۰ تا ٪۱۰۸/۲ است.

جدول ریکاوری

ریکاوری ٪	غلظت اندازه‌گیری شده (mIU /ml)	غلظت پیش‌بینی شده (mIU /ml)	غلظت افزوده شده (mIU /ml)
-	۱۴/۷	-	-
۱۰۰/۰	۲۷/۶	۲۷/۶	۱۲/۹
۱۰۱/۳	۳۸/۵	۳۸/۰	۲۳/۳
۱۰۸/۲	۵۷/۹	۵۳/۵	۳۸/۸
۱۰۴/۸	۷۶/۴	۷۲/۹	۵۸/۲

برای بررسی خطی بودن رقتهای FSH بر روی منحنی چندین نمونه سرمی غلیظ، پس از رقیق شدن متوالی با استاندارد صفر، اندازه‌گیری شده و نتایج یک نمونه برای مثال در جدول زیر آورده شده است. دامنه درصد ریکاوری بدست آمده از ۹۰/۶ تا ۱۰۰/۳ است.

جدول رقت

ریکاوری	غلظت اندازه‌گیری شده (mIU/ml)	غلظت پیش‌بینی شده (mIU/ml)	رقت
-	۱۳۵/۷	-	-
۱۰۰/۳	۶۸/۱	۶۷/۹	۱:۲
۹۲/۳	۳۱/۳	۳۳/۹	۱:۴
۹۰/۶	۱۵/۴	۱۷/۰	۱:۸
۹۴/۱	۸/۰	۸/۵	۱:۱۶

۶. مقایسه با کیت Roche Elecsys: برای بررسی همبستگی آماری بین کیت EIA پادتن علم و کیت Roche Elecsys ، غلظت FSH ۵۰۰ نمـــونه تصادفـی با هـــر دو کیت اندازه گیری شد . مقایسه نتایج بدست آمده ضریب همبستگی ۰/۹۷ را نشان می دهد .

X. References

1. The Nomenclature of Peptide hormones, IUPSC, IUB, Commission on Biochemical Nomenclature. Recommendations (1974), Biochimica et Biophysica Acta 404:152-1555, 1975.

2. Shome, B., Parlow, A.F. Human follicle stimulating hormone (hFSH): First proposal for the amino-acid sequence of the a-subunit of (hFSH) and first demonstration of its identity with the a-subunit of human luteinizing hormone (hLH). Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.

3. Sairam, M.R., Li, C.H. Human pituitary thyrotrophin: Isolation and chemical characterization of its subunits. Biochemical and Biophysical research Communications. 51:336-342, 1973.

4. Shome, B., Parlow, A.F. Human follicle stimulating hormone: First proposal for the amino-acid sequence of the β-subunit (hFSH). Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 39:203-205, 1974.

5. Butt, W. R., Kennedy, J. F. Relation of the structure of gonadotropins to their biological and immunological activities in Margouiles, M. Greenwood, F.C. (eds), Structure-Activity Relationship of Protein and Polypeptide Hormones, Excerpta Medica, Amsterdam. 115-121, 1972.

6. Franchimont, P. Human gonadotropin secretion in male subjects, in James, V.H.T., Serio, M., Martini, L. (eds), The Endocrine Function of the Human Testis, Academic Press, New York. 1:439-458, 1973.

7. Besser, G. M., MacNeilly, A.S., Anderson, D.C., Marshall, J.C., Harsoulis, P., Hall, R., Ormaston, B.J., Alexander, L., Collins, W.P. Hormonal response to synthetic luteinizing hormone and follicle stimulating hormone-releasing hormone in man. British Medical Journal. 3:267-271, 1972.

8. Taymor M.L., Thompson, I.E., Berger, M.J., Patton, W. Luteinizing hormone-releasing (LH-RH) as a diagnostic and research tool in gynecology endocrinology, American Journal of Obstetrics and Gynaecology. 120:721-732, 1974.

9. Wu, CH. Monitoring of ovulation induction. Fertil Steril. 30:617, 1987.

10. Goldzieher, J. W. Polycystic ovarian diseases. Fertile Steril 35:371-394, 1981.

احتیاط!

با توجه به اینکه محلول‌های به‌کار رفته در این کیت‌ها حاوی مواد سمی مانند تیمروزال و مواد پروتئینی با منشا انسانی و حیوانی هستند، و اینکه با هیچ تستی نمی توان از عدم وجود ویروس‌هایی چون HCV، HBV، HIV در این محلول‌ها اطمینان کامل حاصل کرد، خواهشمند است هنگام کار احتیاط‌های لازم از جمله استفاده از دستکش، امتناع از خوردن و آشامیدن و سیگار کشیدن، خودداری از پیپت کردن با دهان و پرهیز از هرگونه تماس محلول با چشم و دست‌ها، رعایت شود.

Rev: Apr.2020

تهران ۱۴۱۶۸، خیابان طالقانی غربی، خیابان شهید سرپرست (کیوان جنوبی)، پلاک ۲۶
تلفن و فکس: ۶۳۴۸۱(۰۲۱)