

FSH ELISA Kit



کیت سنجش FSH به روش الایزا

حیطه کاربرد:

کیت الایزا سنجش FSH پیشتازطب برای سنجش کمی هورمون محرک فولیکول (FSH) در نمونه سرم انسان طراحی شده است. این کیت به عنوان یک ابزار کمک تشخیصی در ارزیابی عملکرد محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد و بررسی اختلالات عملکردی گنادها، در کنار سایر یافته های بالینی و روش های تشخیصی مورد استفاده قرار می گیرد. محتوای این کیت تنها برای تشخیص آزمایشگاهی می باشد.

مقدمه:

FSH هورمونی گلیکوپروتئینی است که از سلول های بازوفیلیک بخش قدامی غده هیپوفیز ترشح می شود. ترشح FSH توسط هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRh) تحریک می گردد. هورمون های استروئیدی گنادها، مانند پروژسترون، استروژن و آندروژن ها دارای اثرات فیدبک مثبت و منفی در ترشح FSH هستند. ترشح FSH دارای یک الگوی نوسانی می باشد که در خانم ها نسبت به آقایان با وضوح بیشتری قابل مشاهده است. در خانم ها در دوره عادت ماهانه غلظت FSH متغیر است؛ بدین ترتیب که در آغاز عادت ماهانه (فاز فولیکولار) FSH با اثر بر فولیکول های تخمدان باعث بلوغ آن ها می گردد، و با افزایش FSH در اواسط دوره عادت ماهانه عمل تخمک گذاری (Ovulation) صورت می پذیرد. غلظت FSH در اوایل عادت ماهانه (فاز فولیکولار) به صورت خفیفی بالاتر از غلظت آن در اواخر دوره (فاز لوتال) می باشد. در خانم های یائسه، به علت فقدان اثر مهاری هورمون های استروئیدی مترشحه از تخمدان، مقدار FSH به صورت 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 خانم ها به منظور بررسی و تشخیص اختلالات عادت ماهانه، آمنوره اولیه و ثانویه، هیرسوتیزم و ویریلیزم به کار می رود. ضمناً FSH شاخص مناسبی برای بررسی آغاز یائسگی در خانم ها است. سنجش FSH در آقایان در موارد ناباروری، هیپوگنادیسم، ژنیکوماستی و برخی تومورها حائز اهمیت می باشد. در کودکان، سنجش FSH به منظور بررسی بلوغ جنسی زودرس و یا تاخیری به کار 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 بادی های مونوکلونال می باشد. در این روش، چاهک ها توسط آنتی بادی هایی علیه یک شاخص آنتی ژنیک زیر واحد بتای مولکول FSH پوشش (Coating) داده می شوند. نمونه بیماران با آنتی بادی پوشش داده شده در ته چاهک ها مجاور می شود. سپس آنتی بادی ثانویه ضد FSH متصل به آنزیم HRP به چاهک ها اضافه می شود. مقدار کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهک ها با غلظت FSH در نمونه ها متناسب است. پس از شستشو، محلول رنگزا که حاوی هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و کروموزن است، داخل چاهک ها ریخته می شود. رنگ آبی پدید آمده با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهک ها متناسب است. با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که بهترین جذب نوری را در طول موج 450 nm دارد.

محتویات کیت:

- ۱) پلیت حاوی چاهک های پوشش داده شده با آنتی بادی ضد FSH (Anti-FSH Coated Plate).
- ۲) محلول آنزیم کونژوگ (Enzyme Conjugate): ویال حاوی محلول کونژوگه شده با آنزیم HRP (آماده مصرف).
- ۳) سری استاندارد (Standard Set): ۶ ویال استاندارد شامل غلظت های صفر، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ IU/L از FSH کالیبره شده در مقابل استاندارد 1st WHO IRP 83/575
- ۴) سرم کنترل (Control Serum): یک ویال حاوی سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال.
- ۵) محلول شستشو (Wash Solution): یک ویال حاوی محلول شستشوی غلیظ (20X). به منظور تهیه محلول شستشوی آماده مصرف مقدار لازم از محلول شستشوی غلیظ را به نسبت ۱:۲۰ با آب مقطر رقیق کنید.
- ۶) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate): ویال حاوی تترامیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده مصرف).
- ۷) محلول متوقف کننده (Stop Solution): یک ویال حاوی اسید کلریدریک ۱ نرمال.
- ۸) برچسب مخصوص پلیت.
- ۹) دفترچه راهنمای محصول.

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

- ۱) دستگاه الایزا ریدر (ELISA Reader) دارای فیلتر 450 nm (و در صورت امکان 630 nm به عنوان فیلتر رفرانس).
- ۲) سمپلرهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری دقیق.
- ۳) آب مقطر.

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان:

- ۱) محتویات این کیت فقط برای مصرف در همین کیت می باشد.
- ۲) از مخلوط کردن محتویات کیت ها با شماره ساخت های مختلف جداً خودداری نمایید.
- ۳) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBSAg و آنتی بادی های ضد HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند. برای احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند.
- ۴) نمونه ها، استانداردها، کنترل ها و چاهک های استفاده شده، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند. تمامی محلول های واکنش گر و معرف ها باید مطابق با مقررات ملی دفع پسماندهای عفونی امحا شوند.



FSH ELISA Kit



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 ۲ تا ۸ 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. برای نگهداری بیش از مدت دو روز باید از دمای ۲۰- درجه سانتی گراد استفاده گردد. در ضمن باید از ذوب و انجماد مکرر نمونه پرهیز شود. از نمونه های مشکوک به آلودگی میکروبی برای انجام آزمایش استفاده نشود.

توضیحات عمومی:

- قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به دمای اتاق برسانید.
- بهرتر 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 اندازه گیری می باشد.
- برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها به صورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند.
- در هنگام سمپلینگ تمام محلول ها 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 محلول های مورد نیاز را آماده نموده و در محلول های مورد نیاز را باز کنید. این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیق تر 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 به طول نیانجامد.
- شستشوی صحیح با مقدار مناسب بافر شستشو برای حصول نتایج قابل اعتماد بسیار ضروری است.

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.
- مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر استاندارد، سرم کنترل و نمونه را در هر چاهک بریزید. پیشنهاد می گردد استانداردها و نمونه ها به صورت دپلیکیت (Duplicate) استفاده شوند؛ به این معنی که هر استاندارد و نمونه در دو چاهک قرار گیرد و در نهایت از میانگین جذب نوری آن ها برای محاسبه نتایج استفاده شود.
- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگ (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 برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۸-۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید.
- محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشوید (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 چاهکها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید. 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 واکنش های آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزا ریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نمایید (توصیه می شود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد).

محاسبه نتایج:

از هر دستگاه الایزا ریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm می توان استفاده نمود.

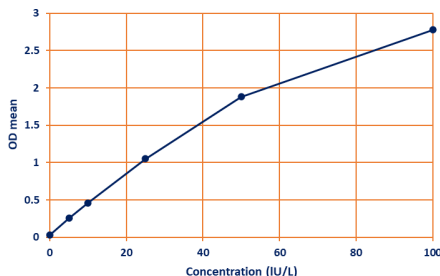
- جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید.
- با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آن ها نموداری (Point to Point) رسم کنید؛ به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آن ها 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.
- 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، به طوری که 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. (برای این کار می توانید از محاسبه گر خودکار پیشتاز طب استفاده کنید).



FSH ELISA Kit



جذب نوری	استانداردها (IU/L)
۰/۰۲۸	۰
۰/۲۵۵	۵
۰/۴۶۰	۱۰
۱/۰۵۰	۲۵
۱/۸۸۲	۵۰
۲/۷۷۸	۱۰۰



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

مقادیر مورد انتظار:

مقادیر نرمال FSH در سرم افراد سالم که توسط تست‌های مکرر به روش الایزا بدست آمده به قرار زیر می‌باشد ولی پیشنهاد می‌گردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد:

میانگین محدوده طبیعی (IU/L)	محدوده طبیعی (IU/L)
۵/۶	۱/۵ - ۹/۷
۱۴	۸ - ۲۰
۴/۱	۱/۱ - ۷/۲
۷۰	۳۰ - ۱۱۰
۶	۲ - ۱۰

خانم‌های نرمال قبل از یائسگی:

فاز فولیکولار

اواسط عادت ماهانه

فاز لوتئال

خانم‌های یائسه

مردان زیر ۶۰ سال

شاخص‌های اجرایی:

(۱) حداقل مقدار قابل اندازه‌گیری:

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت FSH قابل تشخیص در این کیت 1 IU/L می‌باشد. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP17-A2 انجام شده است.

(۲) دقت آزمایش:

آزمایش‌های درون‌سنجی (هم‌خوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و میان‌سنجی (هم‌خوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایش‌های مختلف) با استفاده از ۳ سرم با غلظت‌های مختلف hFSH انجام گردید که در جداول ۱ و ۲ آمده است. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP05-A3 انجام شده است.

جدول ۱ - نتایج Intra Assay

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (IU/L)	SD	CV%
۱	۳۴	۷	۰/۲	۲/۹
۲	۲۴	۱۹	۰/۸	۴/۲
۳	۲۴	۶۲	۴/۱	۶/۶

جدول ۲ - نتایج Inter Assay

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 به صورت Duplicate انجام شده است.

(۳) ریکاوری آزمایش:

مقادیر معلومی از hFSH به ۴ نمونه سرم با غلظت‌های مشخص hFSH افزوده شد و ریکاوری آن‌ها محاسبه گردید. نتایج مربوطه در جدول ۳ آمده است. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP34 انجام شده است.

FSH ELISA Kit



جدول ۳ - نتایج ریکاوری آزمایش.

نمونه	مقدار hFSH موجود در نمونه (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	۷۳/۵	۶۹	۹۵

۴ خطی بودن آزمایش:

با استفاده از استاندارد صفر، رقت‌های متوالی از ۴ نمونه سرم با غلظت مشخص از hFSH تهیه گردید و نتایج بر اساس ضرب رقت محاسبه شد که در جدول ۴ آورده شده است. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP06-A انجام شده است.

جدول ۴ - نتایج بررسی خطی بودن آزمایش.

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

۵ اختصاصیت آزمایش:

اختصاصیت این آزمایش به کمک سرم‌هایی با غلظت‌های مختلف hTSH، hLH و hCG به منظور بررسی واکنش‌های متقاطع با hFSH سنجیده شد که نتایج آن در جدول ۵ آمده است. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP14-A3 انجام شده است.

جدول ۵ - نتایج تست اختصاصیت (واکنش متقاطع).

آنالیت	غلظت (µg/ml)	غلظت ظاهری hFSH (IU/L)
hLH (IU/L)	۵۰۰	< ۱
	۲۵۰	
	۱۰۰	
	۵۰	
hTSH (mIU/L)	۵۰۰	< ۱
	۲۵۰	
	۱۰۰	
	۵۰	
hCG (IU/L)	۲۰۰۰۰	< ۱
	۱۰۰۰۰	
	۱۰۰۰	
	۱۰۰	

۶ اثر هوک (Hook Effect):

آزمایش hFSH بر روی سرم‌هایی با غلظت بسیار بالا از این آنالیت (تا ۲۵۰۰ IU/L) صورت گرفت که پدیده هوک مشاهده نشد. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP34 انجام شده است.

FSH ELISA Kit



منابع:

- [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.](#)



FSH ELISA Kit



جدول علائم:

	Use by	تاریخ انقضاء
	Batch code	شماره سری ساخت
	Serial number	شماره سریال
	Date of manufacture	تاریخ تولید
	Catalogue number	شماره کاتالوگ
	Caution: consult accompanying documents	توجه به مدارک همراه
	Manufacturer	تولیدکننده
	Contains sufficient for <n> tests	محتویات برای n تست کافیت
	In vitro diagnostic medical devices	فراورده تشخیصی
	Temperature limitation	محدوده دمای نگهداری
	Consult instructions for use	کتابچه راهنما
	Biological risks	خطرات زیستی
	Control	کنترل
	Negative control	کنترل منفی
	Positive control	کنترل مثبت

۶

آدرس: تهران، شهرک گلستان، بلوار گل‌ها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
 تلفن: ۴۲۱۹۷۰۰۰، پیامک: ۳۰۰۰۷۱۴۰۲
info@pishtazteb.com, www.pishtazteb.com
 ویرایش هفتم - مهر ۱۴۰۴



FSH ELISA Kit



روش انجام آزمایش FSH به صورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی بادی به منظور تست FSH			
محلول ها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
استانداردها	۵۰ میکرولیتر	-	-
سرم کنترل	-	۵۰ میکرولیتر	-
نمونه	-	-	۵۰ میکرولیتر
آنزیم کوئزوگه	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
پلیت را به ملایمت برای مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهکها بخوبی مخلوط شوند و سپس دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید. ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید.			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید.			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را با طول موج 450 nm (و در صورت امکان 630 nm به عنوان فیلتر رفرانس) خوانش کنید.			

جدول محتویات کیت

محتویات کیت	فرمت ۴۸ تستی	فرمت ۹۶ تستی	فرمت ۱۹۲ تستی
پلیت Plate	1×48-wells	1×96-wells	2×96-wells
محلول آنزیم کوئزوگه Enzyme Conjugate	1×6 ml	1×12 ml	2×12 ml
سری استانداردها Standard Set	St.0: 1×1 ml Other St.: 5×0.5 ml	St.0: 1×2 ml Other St.: 5×1 ml	St.0: 1×4 ml Other St.: 5×2 ml
سرم کنترل Control Serum	1×0.5 ml	1×1 ml	1×2 ml
محلول شستشو Wash Solution	1×25 ml	1×50 ml	2×50 ml
محلول متوقف کننده Stop Solution	1×6 ml	1×12 ml	2×12 ml
محلول رنگزای یک مرحله ای Chromogen - Substrate	1×6 ml	1×12 ml	2×12 ml
برچسب مخصوص پلیت Cardboard Sealer	1	1	2
دستورالعمل استفاده Instruction for Use	1	1	1