www.padyabteb.com

FSH

Fertility ELISA Kits

REF: PT-EFS-201

IVD

مقدمه

هورمون محرک فولیکول (FSH) گلیکوپروتئینی متشکل از دو زنجیره آلفا و بتا می‌باشد که توسط اتصالات غیرکوالانسی بهم متصل شده‌اند. زنجیره آلفا از ۹۸ آمینواسید ساخته شده است، که از لحاظ ساختمانی با دیگر هورمون‌های گلیکوپروتئینی(HCGLH,TSH)مشابه‌است.زنجیره بتا که برای هر هورمون اختصاصی است مسئول فعالیت ایمونولوژی خاص FSH می‌باشد. FSH توسط سلول‌های بازوفیل هیپوفیز قدامی سنتز و ترشح می‌شود. هورمون رها کننده گنادوتروپین (GnRH) که از هیپوتالاموس ترشح می‌شود، رهایی FSH از هیپوفیز را تنظیم می کند. فعالیت هیپوتالاموس و هیپوفیز تحت تأثیر غلظت استروئیدهای گردش خون کم و زیاد می‌شود (فیدبک منفی).

در زنان، FSH با اتصال به گیرنده‌های موجود در سطح سلول‌های گرانولوزا مستقیما باعث تحریک رشد و بلوغ فولیکول‌های تخمدان و ترشح استروژن از آن ها می‌شود. در سیکل قاعدگی سطح سرمی FSH از یک شکل دوره‌ای متابعت می‌کند که منطبق بر تیتر خونی پروژسترون و استرادیول است. بلافاصله کوتاهی قبل از تخمک گذاری، افزایش واضحی در مقدار FSH مشاهده می‌شود که همراه با افزایش LH باعث پاره شدن فولیکول بالغ می‌شود.

FSH در مردان تنظیم کننده اسپرماتوژنز است. برخلاف استروژن، هورمون‌های مردانه (آندروژن ها) غلظت FSH را کاهش نمی‌دهند و اثبات یک ارتباط فیدبک تنها از طریق LH امکان پذیر می‌باشد. به دلایلی که بخوبی شناخته نشده است، در مردان با آزواسپرمی و الیگواسپرمی غلظت FSH افزایش می‌یابد. در روش‌های ایمونواسی، در تومورهای بیضه معمولا غلظت FSH کاهش و غلظت LH افزایش را نشان می‌دهد. تصور می‌شود که این افزایش کاذب LH بواسطه واکنش متقابل با ترکیبات شبه hCG باشد که توسط تومور بیضه تولید می‌شود.

اساس روش اندازه‌گیری

این تست به کمک آنتی بادی مونوکلونال اختصاصی به روش ساندویچی طراحی شده است. بدین صورت که یک آنتی بادی مونوکلونال Anti FSH برروی فاز جامد و یک آنتی بادی Anti – FSH دیگر برای کونژوگاسیون با آنزیم (HRP) مورد استفاده قرار گرفته است. با افزودن نمونه سرم مولکول FSH به طور همزمان با دو آنتی‌بادی فوق واکنش داده و بین آنتی بادی متصل به فاز جامد و آنتی‌بادی کونژوگه شده با آنزیم ساندویچ می‌گردد.

پس از گذشت زمان انکوباسیون (۴۵ دقیقه) در دمای اتاق و شستشو چاهک‌ها توسط محلول شستشو دهنده و اضافه کردن محلول سوبسترا و محلول رنگزا و انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه رنگ آبی ظاهر می‌گردد. با اضافه کردن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می شود. شدت رنگ در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری می‌گردد.

شدت رنگ رابطه مستقیم با غلظت FSH در نمونه دارد.

محتویات کیت

ردیف	نام محصول	حجم/ تعداد
1	پلیت پوشانده شده با آنتی بادی مونوکلونال Anti-FSH (Anti FSH Coated plate)	1X96 test
2	محلول آنزیم کونژوگه آماده مصرف (FSH Enzyme conjugate)	1X12 ml
3	استاندارد در غلظت 0.0 mlu/ml (Cal FSH 0.0 mlu/ml)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 5 mlu/ml (Cal FSH 5 mlu/ml)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 10 mlu/ml (Cal FSH 10 mlu/ml)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 25 mlu/ml (Cal FSH 25 mlu/ml)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 50 mlu/ml (Cal FSH 50 mlu/ml)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 100 mlu/ml (Cal FSH 100 mlu/ml)	1X0.5 ml
4	بافر شستشوی غلیظ 20X (Wash Buffer)	1X30 ml
5	محلول سوبسترا – رنگزا (Chrom Substrte)	1X11ml
6	محلول متوقف‌کننده (اسیدکلریدریک یک نرمال) (Stop Solution)	1X6 ml
7	سرم کنترل به همراه نگهدارنده (Control serum)	1X0.5 ml
8	برچسب مخصوص پلیت	۱ عدد

+ محلول شستشو، رنگزا و متوقف کننده در همه کیت‌ها مشترک می‌باشند.

+ استانداردها در بافر حاوی نگهدارنده هستند، که در مقابل استاندارد 3rd IS, HMG,NIBSC /WHO کالیبر شده‌اند.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند

1- سمپلرهای ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری

2- آب مقطر

3- دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری به عنوان فیلتر رفرانس

4- کاغذ جاذب رطوبت

نگهداری کیت

1- کیت در یخچال در دمای ۸-۲ °c نگهداری شود.

2- میکروپلیت‌ها باید در کیسه در بسته به همراه نمگیر نگهداری شود.

3- مدت زمان پایداری کیت تا پایان تاریخ انقضا (یکسال از زمان تولید) نوشته شده برروی برچسب کیت می‌باشد.

4- کیت باز شده حداقل به مدت ۲ ماه در دمای ۸-۲ °c پایدار خواهد بود.

5- محلول شستشوی رقیق شده به نسبت ۱ به ۲۰ به مدت یک هفته در دمای ۸-۲ °c قابل نگهداری و مصرف می‌باشد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه

پس از جداسازی سرم از نمونه خون بیمار، نمونه را می‌توان به مدت ۴۸ ساعت در درمای ۸-۲ °c نگهداری شوند. جهت نگهداری طولانی‌تر، نمونه‌ها باید در دمای ۲۰ °c- نگهداری شوند. نمونه‌های ذوب شده باید قبل از آزمایش مخلوط شوند. بهتر است ترجیحاً از نمونه‌های با کدورت بالا، همولیز و لیپمیک استفاده نشود. در ضمن باید از فریز و ذوب مکرر نمونه‌ها (Freeze-Thaw) اجتناب گردد.

نکات قابل توجه

1- کیت فقط جهت استفاده در آزمایشگاه تشخیصی کاربرد دارد.

2- استفاده از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه جهت دقت و صحت بیشتر.

3- شستشو چاهک‌ها به صورت کامل جهت نتیجه بهتر.

- بررسی چاهک‌ها از نظر وجود حباب.
- خارج کردن حباب از چاهک‌ها با زدن ضربه آهسته به پلیت.

4- عدم ترکیب اجزاء کیت با سری ساخت متفاوت.

5- جلوگیری از تعویض درب معرف‌ها.

6- جلوگیری از تماس معرف به ویژه معرف حاوی اسیدکلریدریک با پوست (در صورت تماس با آب کافی شستشو داده شود).

7- از استعمال دخانیات، خوردن و آشامیدن اجتناب شود.

8- از پی‌پت کردن مواد با دهان پرهیز شود.

9- از دستکش و کلاه مناسب استفاده شود.

+ جهت ساخت برخی از اجزای این کیت از سرم انسانی که از نظر HCV، HbsAg، HIV منفی می‌باشد، استفاده شده است.

آماده سازی معرف‌ها

1- همه معرف‌ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (۲۵–۱۸ درجه سانتی گراد) برسند.

2- تهیه محلول شستشو: برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمائید.

نکته‌های مهم

1- توصیه می‌شود که بیشتر از ۳۲ چاهک در هر ران کاری استفاده نشود. اگر پی‌پت به صورت دستی انجام می‌گیرد، پی‌پت کردن همه استانداردها، نمونه‌ها و کنترل‌ها باید در ۵ دقیقه تمام شود. برای پی‌پت کردن کل پلیت ۹۶ تستی باید از دستگاه اتوماتیک استفاده شود.

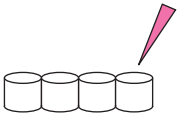
2- فرایند شستشو خیلی مهم است. شستشوی ناکافی باعث کاهش دقت و افزایش کاذب جذب می شود.

3- در مواردی که مقدار FSH نمونه بیش از ۱۰۰ mIU/ml باشد، نمونه را با استاندارد صفر رقیق نموده و سپس آزمایش را تکرار کنید.

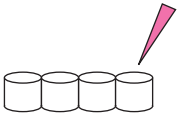
روش انجام آزمایش

1- انتخاب تعدادچاهک‌های کوت شده برای استانداردها، کنترل و نمونه‌های بیمار بصورت دوتایی و قراردادن مابقی چاهک‌ها در کیسه مخصوص به همراه نمگیر و بستن درب آن.

2- ۲۰µl استانداردها، کنترل و نمونه‌ها به چاهک‌ها اضافه نمایید.



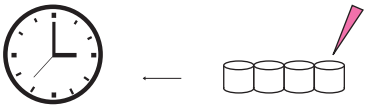
3- ۱۰۰µl آنزیم کونژوگه HRP به تمام چاهک‌ها اضافه نمایید.



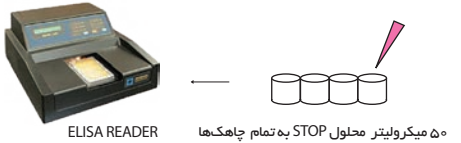
4- پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید و سپس درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.

5- محتویات چاهک‌ها را خالی کنید و چاهک‌ها را ۵ بار با ۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشوی آماده شستشو دهید. سپس چاهک‌ها را وارونه کنید و همراه با تکان دادن خالی کنید و در انتهای شستشو با ضربات ملایم بر روی کاغذ جاذب تمامی مایع موجود در چاهک‌ها را تخلیه نمایید.

6- ۱۰۰µl از سوبسترای آماده مصرف به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید.



7- ۵۰ µl از محلول متوقف کننده به همه چاهک‌ها اضافه کنید. سپس جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت کنید (در صورت امکان از طول موج ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید). سنجش جذب نوری باید حداکثر تا ۱۵ دقیقه پس از انجام آزمایش انجام شود.



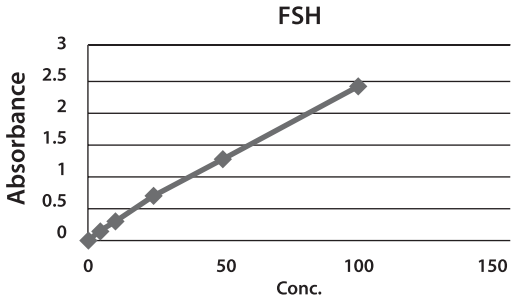
محاسبه نتایج

1- با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) برروی کاغذ میلی‌متری، منحنی استانداردی رسم کنید.

2- میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

راهنمای محاسبه

مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل تنها به عنوان راهنمایی آورده شده است و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید بدست آورد.



ردیف	مقدار استاندارد (mlu/ml)	جذب
۱	۰	۰/۰۲۸
۲	۵	۰/۱۴۷
۳	۱۰	۰/۳۰۵
۴	۲۵	۰/۶۷۴
۵	۵۰	۱/۳۱۲
۶	۱۰۰	۲/۳۸۷

مقادیر طبیعی

بدلیل اختلافات سنی، نژادی و رژیم تغذیه، نمی‌توان برای تمام جمعیت‌ها محدوده مرجع تعیین کرد. بنابراین هر آزمایشگاه باید محدوده مرجع خود را گزارش نماید. مقادیر طبیعی در سرم افراد نرمال که توسط آزمایشات مکرر به روش الایزا بدست آمده است به قرار زیر می‌باشد:

فاز فولیکولار	۲/۳–۹/۲ mlu/ml
نیمه سیکل ماهیانه	۷/۰–۱۸/۶ mlu/ml
فاز لوتئال	۱/۵–۶/۰ mlu/ml
یائسگی	۲۰–۱۰۰ mlu/ml
مردان	۱/۰–۱۲ mlu/ml
کودکان ۱ تا ۱۰ سال	۰/۶–۶/۰ mlu/ml

خصوصیات کیت

1- حساسیت آنالیتیکال (حد تشخیص):

برای تعیین حد تشخیص ۲۰ مرتبه استاندارد صفر آزمایش شد. حد تشخیص از ۲ انحراف معیار (SD) بالاتر از میانگین جذب در غلظت صفر بدست آمد. حد تشخیص برای این کیت ۱/۰mlu/ml بدست آمد.

2- دقت:

برای محاسبه میزان دقت در یک روز (درون سنجی) و روزهای مختلف، (میان سنجی) آزمایش بر روی ۳ نمونه سرم ۲۰ بار تکرار شد که ضریب تغییرات به شرح ذیل است.

دقت درون سنجی				
نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (mIU/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
۱	۲۰	۶/۰۱	۰/۲۸	۴/۶
۲	۲۰	۱۶/۶۲	۰/۹۱	۵/۴۵
۳	۲۰	۴۰/۶	۱/۷۶	۴/۳۵

دقت میان سنجی				
نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (mIU/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
۱	۲۰	۶/۰۹	۰/۳۷	۶/۱۲
۲	۲۰	۱۶/۸۳	۰/۹۴	۵/۵۸
۳	۲۰	۴۱/۱۷	۲/۴۲	۵/۸۹

3- ویژگی:

آنتی بادی‌های مونوکلونال مورد استفاده در این کیت الایزا اختصاصی FSH انسانی می‌باشند. هیچگونه تداخلی با LH، TSH و HCG انسانی در غلظت‌های طبیعی دیده نشده است.

نوع ماده	غلظت	درصد تداخل
hCG	۲۵۰۰۰IU/L	۰/۰۸
LH	۵۰۰mIU/ml	۰/۱۶
TSH	۵۰۰µIU/ml	۰/۰۵

4- خطی بودن:

سه نمونه مختلف سرمی با استاندارد صفر به نسبت‌های ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۸ رقیق شدند. سپس غلظت FSH در آنها با استفاده از کیت محاسبه شد که نتایج ذیل بدست آمد.

نمونه سرمی	غلظت اولیه (mIU/ml)	درصد بازیابی		
		۱:۲	۱:۴	۱:۸
۱	۳۸	۱۰۴	۱۰۸	۱۱۰
۲	۶۲	۱۰۵	۱۰۶	۱۰۵
۳	۹۱	۹۸	۱۰۵	۱۰۳

5- اثر هوک:

در این کیت، اثر هوک تا غلظت ۲۰۰۰ mlu/ml دیده نشد.

+ References

1. Hopton M. R, et al Clinical Chemistry, 32, 691 (1986)
2. Caldwell, G. et al. Lancet, I, 1117, (1985)
3. Young, D. S, et al Clinical Chemistry 21, 3660 (1975)
4. Spencer, CA, et al Clinical Chemistry 41, 367 (1995)
5. Beck-Peccoz P, et al Eur. J. Endocrinol 131: 331-340 (1994)
6. Bravemann, L. E, Clinical Chemistry 42: 174- 181 (1996)

پاره‌ای نکات علمی در خصوص رفع مشکلات احتمالی در کیت‌های الایزا :

	علت مشکل	راه حل
پایین بودن OD استانداردها و نمونه‌ها	افت و یا آلودگی کونژوگه	تکرار تست با کونژوگه جدید
	پایین بودن دما و یا کوتاه بودن زمان انکوباسیون، به دما نرسیدن محلول‌های کیت و نمونه بیماران	• دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید. • قبل از شروع آزمایش کیت و نمونه بیماران به دمای اتاق برسد.
	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها	• PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. • پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	• پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. • پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.

	طول موج خوانش نامناسب (۴۰۵ نانومتر بجای ۴۵۰ نانومتر)	• تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. • طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
عدم تولید رنگ در چاهک‌ها	استفاده از مواد سایر کیت‌ها	تکرار تست با مواد همان کیت
	انجام نشدن مرحله‌ای از تست	تکرار تست
	آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید	تکرار تست با محلول کونژوگه جدید
صحیح نبودن نمودار	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید

صحیح نبودن نمودار	پی‌پتینگ نامناسب	• استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف. • از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده‌کنید. • توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. • توجه کنید در هنگام پی‌پتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود.
	PH نامناسب و یا غلظت بالای، Wash Buffer	PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید.
	شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها	پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید.

بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD	آلودگی استاندارد صفر	تکرار تست با استانداردهای جدید
	آلودگی محلول رنگزا	استفاده از محلول رنگزا جدید
	آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نامناسب	• عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. • تمام سوزن‌های دستگاه واشر را چک کنید.
	طول موج نامناسب در خوانش	• تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. • طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. • از فیلتر ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس استفاده‌کنید.

	آلودگی محلول Stop	تکرار تست با محلول Stop جدید
	ایجاد وقفه در خوانش	بلافاصله بعد از Stop کردن تست، یا حداکثر تا ۱۵ دقیقه پلیت را بخوانید.
عدم تکرار پذیری مناسب	پی‌پتینگ نا مناسب	• استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف • از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید. • توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. • توجه کنید در هنگام پی‌پتینگ حباب وارد نشود. • توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد. • کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلرها.

عدم تکرار پذیری مناسب	طولانی شدن زمان انجام تست	فاصله زمانی بین اضافه کردن استانداردها و نمونه نباید بیشتر از ۱۰ دقیقه باشد. در این صورت نتایج قابل اعتماد نیست.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	• پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. • پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.
	باقی ماندن کونژوگه در لبه چاهک‌ها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها.	پی‌پتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	وجود حباب در چاهک‌ها	در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک‌ها نباشد.
	کثیف بودن کف چاهک‌ها	کف چاهک‌ها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید.
	مخلوط نشدن محلول‌های کیت	قبل از استفاده از ویال محلول‌ها را به آرامی تکان دهید.

خلاصه روش آزمایش

معرف‌ها	استانداردها	نمونه‌ها
استانداردها	۲۰µl	–
نمونه‌ها	–	۲۰µl
کونژوگه	۱۰۰µl	۱۰۰µl

در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه نمایید.

۵ بار با ۳۵۰µl محلول بافرشستشو رقیق شستشو دهید و با دقت محتویات را خالی کنید.

محلول رنگزا	۱۰۰ µl	۱۰۰ µl

به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی انکوبه نمایید.

محلول متوقف کننده	۵۰ µl	۵۰ µl

جـذب نوری هر چاهـک در طول موج ۴۵۰ nm و فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm قرائت شود.

www.padyabteb.com

PADYABTEB
Producer of Diagnostic Products

دفتر فروش و خدمات پس از فروش:

تهران . ۲۴ متری سعادت آباد . خیابان یکم شرقی . خیابان شب بو شرقی . پلاک ۱۷
طبقه دوم . واحد ۸ **تلفن:** ۴۲۰۸۷۳۰۰ (۰۲۱) **خدمات پس از فروش:** ۰۹۱۲۹۴۰۹۱۲۴

کارخانه:

شهرک صنعتی اشتهارد . بلوار ابوریحان بیرونی . بلوار غزالی غربی . خیابان لادن ۲
تلفن: ۸ ـ ۳۷۷۷۵۵۳۱ (۰۲۶) **فکس:** ۳۷۷۷۵۵۲۹ (۰۲۶)

ISO 13485

eztest
ELISA Kits