

کیت ایمونورادیومتریکی اسی برای تعیین غلظت هورمون محرک

فولیکولی انسانی

Human Follicle Stimulating Hormone (FSH) IRMA Kit

مقدمه :

هورمون محرک فولیکولی (FSH) ملکوای گلیکوپروتئینی بزرگی است که دارای دو زیر واحد آلفا و بتا می باشد. زیر واحد آلفا در سه هورمون TSH، LH و FSH مترشح از هیپوفیز قدامی یکسان هستند، در حالیکه زیر واحد بتا در آنها متفاوت بوده و این زیر واحد توانایی اتصال به رسپتور مربوطه را داراست. این هورمون از هیپوفیز قدامی از سلول هایی تحت عنوان گنادوتروف ها ترشح می شوند. همانگونه که از نام هورمون محرک فولیکولی (FSH) مشخص است این هورمون تحریک کننده بلوغ فولیکول های تخمدان در زنان است. همچنین در مردان این هورمون، برای تولید اسپرم ضروری است. در واقع این هورمون، حامی عملکرد سلولهای سرتولی است. سلولهای سرتولی بنوبه خود، حامی بلوغ سلول های اسپرم می باشد. تعیین غلظت این هورمون در مسئله باروری حائز اهمیت می باشد.

اساس روش اندازه گیری :

کیت IRMA FSH موجود، براساس سنجش ایمونولوژیکی رادیواکتیو ساندویچی تهیه شده است. FSH موجود در نمونه ها بعنوان آنتی ژن به دو آنتی بادی زوج اختصاصی خود متصل می گردد. هر دو آنتی بادی از نوع منوکلونال موشی هستند که یکی بر روی فاز جامد (لوله ها) پوشش داده شده است و دیگری به ید- ۱۲۵ متصل شده است. نمونه مورد آزمایش که دارای FSH است، در معرض دو آنتی بادی قرار می گیرد. پس از زمان انکوباسیون، چاهک ها تخلیه شده و شستشو داده می شوند تا آنتی بادی متصل به ید- ۱۲۵ اضافی خارج گردد. سپس اکتیویته موجود در هر لوله توسط شمارنده گاما اندازه گیری می شود که این اکتیویته بطور مستقیم با غلظت FSH در نمونه ها متناسب است. استانداردهای FSH با غلظت مشخص، همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که براساس منحنی استاندارد مقدار شمارش مقابل غلظت FSH، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید.

معرف ها :

- ۱- لوله های پوشش داده شده: شامل ۱۰۸ لوله که با آنتی بادی منوکلونال موشی ضد FSH پوشش داده شده اند.
- ۲- ردیاب (آنتی بادی علیه FSH نشاندار شده با ید-۱۲۵): یک ویال ۱۲ میلی لیتری آماده مصرف.
- ۳- استانداردها: ۸ ویال یک میلی لیتری از استاندارد با غلظت های ۰،۰۵، ۰،۲۵، ۰،۵، ۱، ۲،۵، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ براساس mIU/ml که در سرم نرمال انسانی تهیه شده و از تیمورسال بعنوان نگهدارنده استفاده شده است.
- ۴- سرم کنترل: دو ویال لیوفیلیزه که باید با ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر تهیه شود.
- ۵- محلول شستشو دهنده غلیظ (20X): یک ویال ۵۰ میلی لیتری محلول شستشو که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف لازم است این محلول به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شود.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

- ۱- سمپلر ۱۰۰ میکرولیتری دقیق
- ۲- آب دیونیزه
- ۳- دستگاه شمارنده گاما
- ۴- کاغذ جاذب رطوبت
- ۵- لوله های آزمایش معمولی برای شمارش تام

نکات قابل توجه برای مصرف کنندگان :

- ۱- در این کیت از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر HbsAg و HIV منفی بوده اند.
- ۲- از استفاده از مواد پس از تاریخ انقضاء خودداری کنید و از مخلوط کردن یا استفاده از کیت ها با شماره بچ مختلف پرهیز نمایید.
- ۳- درب ظروف را پس از استفاده ببندید و از تعویض درب ها جدا خودداری کنید.
- ۴- از لباس و دستکش یکبار مصرف هنگام کار با مواد رادیواکتیو استفاده کنید.
- ۵- لوازم آزمایشگاهی آلوده به مواد رادیواکتیو جداگانه و با روش های ایمن (براساس دستورالعمل های حفاظت در برابر اشعه) شستشو و یا پسماند نماید.

تهیه و جمع آوری نمونه :

- ۱- آزمایش را باید بر روی نمونه های سرمی و پلاسمایی انجام داد. نمونه های شدیداً همولیزه و دارای چربی باید حذف شوند.
- ۲- نمونه ها را می توان برای هفت روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد و برای زمان های طولانی تر (تا سی روز) در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمود.
- ۳- از انجماد و ذوب مکرر نمونه ها باید خودداری کرد.
- ۴- معرف ها باید مستقیماً به لوله ریخته شوند.
- ۵- از تماس نوک سمپلر با ته لوله خودداری کنید.

آماده سازی معرف ها :

- ۱- کلیه معرف ها را به دمای اتاق برسانید. قبل از استفاده آنها را به آرامی سر و ته نمایید.
- ۲- برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمایید.

روش انجام آزمایش :

- ۱- تعداد لوله های پوشش شده برای استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید. برای شمارش تام از لوله های معمولی استفاده کنید.
- ۲- ۱۰۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر لوله بریزید.
- ۳- ۱۰۰ میکرولیتر از ردیاب را به تمام لوله ها اضافه کنید.
- ۴- لوله ها بمدت ۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات آنها خوب مخلوط شوند. سپس لوله ها را بمدت یک ساعت در همزن گردان مخصوص شرکت پادتن گستر ایثار و یا شیکر افقی (با سرعت 280 rpm) در درجه حرارت اتاق (۱۸ تا ۲۵ درجه سانتیگراد) انکوبه کنید.

۱- حساسیت

با تکرار و خوانش جذب استاندارد صفر، حساسیت کیت برای تعیین مقدار FSH، بر اساس محاسبه $0.0 + 3SD$ برابر 0.9 mIU/ml بدست آمد.

۲- دقت

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

ضریب تغییرات در روز

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (mIU/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	20	5.7	0.41	7.2
2	20	22.4	1.19	5.3
3	20	45.3	1.86	4.1

ضریب تغییرات در روزهای مختلف

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (mIU/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	10	6.2	0.51	8.2
2	10	15.2	0.93	6.1
3	10	37.5	1.76	4.7

۳- ویژگی

آنتی بادی های منوکلونال مورد استفاده در این کیت الایزا اختصاصی FSH انسانی می باشند. هیچگونه تداخلی با TSH، LH و HCG انسانی در غلظت های طبیعی دیده نشده است.

۴- خطی بودن

سه نمونه مختلف سرمی با استاندارد صفر به نسبت های 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		
		1:2	1:4	1:8
1	12.5	98	101	105
2	15.7	101	104	104
3	33.4	102	103	103

۵- محتویات لوله ها را از طریق مکش یا وارونه کردن تخلیه نمائید (بجز لوله های شمارش تام). سپس لوله ها را دو بار و هر بار با دو میلی لیتر محلول شستشوی آماده مصرف شستشو دهید. برای اطمینان از تخلیه کامل، با وارونه نگهداشتن لوله ها بر روی کاغذ جاذب و با ضریب ملایم بر روی لوله تمامی مایع موجود در لوله ها را تخلیه کنید.

۶- با استفاده از شمارنده گاما، اکتیویته موجود در لوله ها را بمدت یک دقیقه شمارش کنید.

محاسبه نتایج

۱- با استفاده از میانگین شمارش استانداردها (محور Y) و غلظت م شخص آنها (محور X) بر روی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد رسم کنید.

۲- میانگین شمارش 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 شمارش ارائه شده در جدول ذیل تنها بعنوان راهنمایی آورده شده است و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید بدست آورد.

ردیف	مقدار استاندارد (mIU/ml)	شمارش (n=3)	B/T(%)
0	شمارش تام	225696	----
1	0	327	0.14
2	0.5	827	0.36
3	2.5	2778	1.23
4	5	5067	2.24
5	10	9592	4.25
6	25	22728	1.07
7	50	41161	18.23
8	100	67310	29.82

مقادیر طبیعی

بدلیل اختلافات سنی، نژادی و رژیم تغذیه، نمی توان برای تمام جمعیت ها محدوده مرجع تعیین کرد. بنابراین هر آزمایشگاه باید محدوده مرجع خود را گزارش نماید. در نمونه هایی که در Boarder line قرار دارند، آزمایش مجدد حتما تکرار شود.

مقادیر طبیعی در سرم افراد نرمال که توسط آزمایشات مکرر به روش IRMA بدست آمده است به قرار زیر می باشد:

زنان	
3.0 – 12.0 mIU/ml	فاز فولیکولی
8.0 – 22.0 mIU/ml	میانه دوره ماهیانه
2.0 – 12.0 mIU/ml	فاز لوتئال
35.0 – 151.0 mIU/ml	دوران یائسگی
مردان	
1.0 – 14.0 mIU/ml	مقدار طبیعی

خصوصیات کیت