

کیت اندازه‌گیری هورمون Estradiol در سرم انسان
Estradiol ELISA kit 96t
Cat No: 2824-96 / Rev: 15 (1400/09/27)

مقدمه:

هورمون استرادیول (17β -estradiol) یک ترکیب استروئیدی ۱۸ کربنه است که در آقایان توسط بیضه و در خانم‌ها توسط فولیکول‌های تخمدان، جسم زرد، قشر آدرنال و جفت ترشح می‌شود. اندازه‌گیری سطح سرمی استرادیول در بررسی عملکرد تخمدان، مشکلات قاعدگی و نازایی اهمیت دارد. افزایش این هورمون در سندرم زن‌نمایی، بلوغ زودرس، هیپرتیروئیدیسم و سرطان تخمدان، سرطان بیضه و سرطان آدرنال مشاهده می‌شود و کاهش آن نیز در کم‌کاری هیپوفیز، سندرم ترنر، هیپوگنادیسم و یائسگی رخ می‌دهد. حیطة کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی سطح استرادیول در نمونه سرم یا پلاسما هپارینه انسان به روش الیزا است.

اصول آزمایش:

این آزمایش بر اساس الیزای رقابتی طراحی شده است و بی‌حرکت سازی کمپلکس ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در سطح چاهک و آنتی‌بادی بیوتینیل‌ه مونوکلونال ضد استرادیول صورت می‌گیرد. نمونه‌های سرم و کالیبراتورها که حاوی استرادیول غیر کونژوگه هستند به همراه آنتی‌بادی بیوتینیل‌ه به چاهک‌ها اضافه می‌شوند و سپس، استرادیول کونژوگه (متصل به آنزیم HRP) درون چاهک‌ها ریخته می‌شود. به این ترتیب، استرادیول کونژوگه برای اتصال به جایگاه‌های محدود آنتی‌بادی (که در مرحله اول مصرف نشده‌اند) با استرادیول موجود در نمونه رقابت می‌کند. پس از شستشوی چاهک‌ها، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که بیشترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد. شدت جذب نوری با غلظت استرادیول نمونه‌ها رابطه معکوس دارد. در نهایت سطح استرادیول نمونه‌ها توسط منحنی استاندارد (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
 - ۲) کالیبراتور (Estradiol Cal A-G): هفت ویال با غلظت‌های ۰، ۲۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰ pg/mL تهیه شده از سرم انسان.
 - ۳) محلول کونژوگه آنزیمی (Estradiol Enzyme Conjugate): یک ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌ژن متصل به آنزیم HRP در بافر.
 - ۴) محلول کونژوگه بیوتینی (Estradiol Biotin Conjugate): یک ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی متصل به بیوتین در بافر.
 - ۵) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
 - ۶) محلول رنگزا (Substrate Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
 - ۷) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
 - ۸) محلول کنترل (Estradiol control): ویال (های) ۰/۵ میلی-لیتری با غلظت درج شده بر روی لیبل.
- ۸) برچسب مخصوص پلیت: یک ورق.
- توجه: تمام محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

- ۱) دستگاه خوانش گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
- ۲) سمپلر کالیبره.
- ۳) آب مقطر دیونیزه.

احتیاط در استفاده از کیت:

- ۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
- ۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.
- ۳) توجه فرمایید که محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.

- ۴) محتویات این کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2، HBS، Ag و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین با توجه به احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شوند.
- ۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است و در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری نمایید.
- ۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

- ۱) نمونه مناسب برای این تست سرم یا پلاسما هپارینه است. ناشتا بودن فرد به‌هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
 - ۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین ($>5 \text{ mg/day}$) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.
 - ۳) درب ظروف نمونه باید کاملاً بسته باشد. تا ۵ روز می‌توان نمونه‌ها را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری نمایید.
- #### آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:
- ۱) آماده سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد

قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.

روش انجام آزمایش:

- قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت، کنترل‌ها و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، کنترل‌ها و نمونه‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید
- ۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک‌ها را به همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.
 - ۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها و نمونه‌ها در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.
 - ۳) حجم ۵۰ میکرولیتر کونژوگه بیوتینی به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
 - ۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بیوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
 - ۵) حجم ۵۰ میکرولیتر کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
 - ۶) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بیوشانید و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
 - ۷) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده، (بخش آماده سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بروی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت^۱ اقدام نمایید.
 - ۸) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

1. <http://www.idealdiag.com/Training.aspx>

علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

EC REP	Authorized representative in the European Community
	Date of manufacture
	Use-by date
LOT	Batch code
IVD	In vitro diagnostic medical device
CE	European Conformity
REF	Catalogue number
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit

No.	Sample (pg/mL)	Added (pg/mL)	Exp. (pg/mL)	Obs. (pg/mL)	% Rec.
1	23.3	31.5	27.4	26.5	96.7
2	15.4	42.2	28.8	29.2	101.4
3	58.0	114.6	86.3	89.0	103.1

۴) بررسی درستی - آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست غلظت استرادیول در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش Bias < 10% است.

No.	Sample (pg/mL)	% Bias			
		1/2	1/4	1/8	1/16
1	135.6	2.8	1.1	2.7	1.9
2	155.4	3.1	-2.2	1.1	-3.4
3	187.3	-1.6	1.5	-1.3	-2.5

۵) بررسی ویژگی - آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)

ویژگی این آزمایش با اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مندرج در جدول زیر به نمونه سرم و اندازه‌گیری واکنش متقاطع آن‌ها با استرادیول بررسی شد. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده $100 \pm 10\%$ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Analyte	Cross Reactivity
Androstenedione	0.0003
Dihydrotestosterone	0.0008
Cortisone	<0.0001
Corticosterone	<0.0001
Cortisol	0.0004
Estriol	<0.0001
DHEA-S	<0.0001
Estrone	<0.0001
Testosterone	<0.0001

۶) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با 0.83 pg/mL تعیین گردید.

$$\text{LOD} = \text{LOB} + 1.645 \text{ SD}_s$$

$$\text{LOB} = \text{Mean}_b + 1.645 \text{ SD}_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

Normal Range (pg/mL)	
Females (Follicular Phase)	9 - 175
Females (Luteal Phase)	44 - 196
Females (Periovulatory)	107 - 281
Females (Treated Menopausal)	42 - 289
Females (Untreated Menopausal)	ND - 20
Females (Oral Contraceptives)	ND - 103
Males	4 - 94

• ND: Not Detectable

پارامترهای کنترل کیفی

۱) بررسی دقت - آزمون دقت درون‌دور (Within-Run)

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 11.2\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean Estradiol (pg/mL)	37.4	138.2	234.0
SD (pg/mL)	2.0	6.4	10.3
CV (%)	5.3	4.6	4.4

۲) بررسی دقت - آزمون دقت بین‌دور (Between-Run)

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه) در هر نوبت‌کاری انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 11.2\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean Estradiol (pg/mL)	25.9	114.1	216.3
SD (pg/mL)	1.4	5.6	9.9
CV (%)	5.4	4.9	4.5

۳) بررسی درستی - آزمون بازیابی (Recovery)

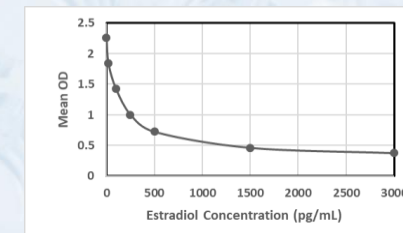
در این تست به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به‌عنوان یک نمونه، غلظت استرادیول در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش، $\text{Bias} < 10\%$ نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ بدست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۹) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

۱۰) شدت جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر، حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید. از طول موج فرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده شود. در این آزمایش محاسبه غلظت به روش Point to Point قابل اجرا است؛ اما روش 4PL (یا Logic-log) ارجحیت دارد. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (pg/mL)
Cal. A	A1	2.264	2.255	0
	B1	2.247		
Cal. B	C1	1.857	1.839	20
	D1	1.821		
Cal. C	E1	1.436	1.424	100
	F1	1.412		
Cal. D	G1	1.010	1.004	250
	H1	0.998		
Cal. E	A2	0.735	0.725	500
	B2	0.715		
Cal. F	C2	0.491	0.463	1500
	D2	0.435		
Cal. G	E2	0.394	0.385	3000
	F2	0.376		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای استرادیول

شرکت تولید کننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر باید برای آنالیت مورد نظر توسط آزمایشگاه مصرف کننده تعیین گردد.