

کیت اندازه گیری هورمون Estradiol در سرم انسان
Estradiol ELISA kit 96t
Cat No: 2824-96 / Rev: C5 (1405/06/29)

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 می شود. اندازه گیری سطح سرمی استرادیول در بررسی عملکرد تخمدان، مشکلات قاعدگی و نازایی اهمیت دارد. افزایش این هورمون در سندرم زن نمایی، بلوغ زودرس، هیپرتیروئیدیسم و سرطان تخمدان، سرطان بیضه و سرطان آدرنال مشاهده می شود و کاهش آن نیز در کم کاری هیپوفیز، سندرم ترنز، هیپوگنادیسم و یائسگی رخ می دهد. حیطة کاربرد این کیت اندازه گیری کمی سطح استرادیول در نمونه سرم یا پلاسمای هپارینه انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این آزمایش بر اساس الایزای رقابتی طراحی شده است و بی حرکت سازی کمپلکس ایمنی توسط واکنش بین **استرپتاویدین** تثبیت شده در سطح چاهک و آنتی بادی بیوتینیله مونوکلونال ضد استرادیول صورت می گیرد. نمونه های سرم و کالیبراتورها که حاوی استرادیول غیر کوئوگه هستند به همراه آنتی بادی بیوتینیله به چاهک ها اضافه می شوند و سپس، استرادیول کوئوگه (متصل به آنزیم HRP) درون چاهک ها ریخته می شود. به این ترتیب، استرادیول کوئوگه برای اتصال به جایگاه های محدود آنتی بادی (که در مرحله اول مصرف نشده اند) با استرادیول موجود در نمونه رقابت می کند. پس از شستشوی چاهک ها، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی تولید می شود که بیشترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد. شدت جذب نوری با غلظت استرادیول نمونه ها رابطه معکوس دارد. در نهایت سطح استرادیول نمونه ها توسط منحنی استاندارد محاسبه می گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
 - ۲) کالیبراتور (Estradiol Cal A-G): هفت ویال با غلظت های ۰، ۲۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰ pg/mL تهیه شده از سرم انسان.
 - ۳) محلول کوئوگه آنزیمی (Estradiol Enzyme Conjugate): یک ویال ۶ میلی لیتری حاوی آنتی ژن متصل به آنزیم HRP در بافر.
 - ۴) محلول کوئوگه بیوتینی (Estradiol Biotin Conjugate): یک ویال ۶ میلی لیتری حاوی آنتی بادی متصل به بیوتین در بافر.
 - ۵) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی لیتری.
 - ۶) محلول رنگزا (Substrate Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری.
 - ۷) محلول متوقف کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری.
 - ۸) محلول کنترل (Estradiol control): ویال (های) ۰/۵ میلی لیتری.
 - ۹) برچسب مخصوص پلیت: یک ورق.
- توجه ۱: کلیه محلول ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.
- توجه ۲: مقادیر کنترل (ها) در COA درج گردیده 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 کیت ها و یا شماره های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
- ۲) کلیه محلول ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول هایی که تاریخ انقضاء آن ها گذشته است استفاده نکنید.
- ۳) توجه فرمایید که محلول ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.

- ۴) محتویات این کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2، HBs Ag و HCV بررسی شده اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری زا با استفاده از روش های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین با توجه به احتمال آلودگی و بیماری زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل های 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، کنترل ها، چاهک ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع آوری، آماده سازی و نگهداری نمونه:

- ۱) نمونه مناسب برای این تست سرم یا پلاسمای هپارینه است. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه گیری در درستی نتایج بدست آمده تاثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
 - ۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین ($>5 \text{ mg/day}$) را دریافت می کنند، نمونه گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.
 - ۳) درب ظرف نمونه ها باید کاملاً بسته باشد. تا ۵ روز می توان نمونه ها را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری کرد. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه ها خودداری نمایید.
- آماده سازی و نگهداری معرف ها:**
- ۱) آماده سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد 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، کنترل ها و نمونه ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی گراد) رسیده اند. کالیبراتورها، کنترل ها و نمونه ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.
- ۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک ها را به همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.
- ۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، کنترل و نمونه ها در چاهک های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک ها ریخته شود.
- ۳) حجم ۵۰ میکرولیتر کوئوگه بیوتینی به تمام چاهک ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
- ۴) چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- ۵) حجم ۵۰ میکرولیتر کوئوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
- ۶) چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- ۷) محتویات چاهک ها را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده، (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت گیر بریزید. به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت^۱ اقدام نمایید.
- ۸) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک ها بریزید و پلیت را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ بدست آمد، می توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۵ دقیقه افزایش دهید.

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

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد. مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

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

References:

- McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
 - Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
 - Tietz. Reference information for the clinical laboratory. Hn Textbook of clinical chemistry. Burtis, CA, Ashwood, RA, WB, Saunders. Philadelphia; 1999.
- در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.
- توجه:** چنانچه از دستگاه‌های ایلا پروسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.

دفتر مرکزی: تهران - بزرگراه آشناسان - سردار جنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۸
 کارخانه: کرج - کمالشهر، شهرک صنعتی بهارستان، انتهای گلستان دوم غربی، پلاک ۱۱
 تلفن: ۰۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹-۲۳

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)	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 $8/3 \text{ pg/mL}$ تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

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

(s: Diluted sample & b: Blank)

۷) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

Normal Range (pg/mL)	
Females	
Follicular Phase	21 - 251
Mid-Cycle / Ovulation	38 - 649
Luteal Phase	21 - 312
Postmenopausal (Without HRT)	up to 28
Postmenopausal (With HRT)	up to 144
Males	
Adult Male	11 - 44

* HRT = Hormone Replacement Therapy

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)

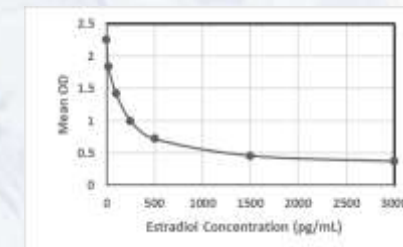
در این تست به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به‌عنوان یک نمونه، غلظت استرادیول در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 10\%$

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

۹) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی 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 رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). در این آزمایش محاسبه غلظت به روش Point to Point و 4PL (یا Logit-log) قابل اجرا است؛ در صورت استفاده از روش 4PL غلظت کالیبراتور A را عددی کوچک (به‌عنوان مثال 0.01 pg/mL) در نظر بگیرید. 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 تعیین گردد.