

کیت اندازه گیری هورمون LH در سرم انسان
LH ELISA Kit 96t
Cat. No: 0224-96 / Rev: D4 (1405/07/07)

مقدمه:

هورمون LH یک هورمون گلیکوپروتئینی است که توسط گنادوتروپها در لوب قدامی غده هیپوفیز سنتز و ترشح می شود. این هورمون همانند FSH، TSH و hCG از دو زیر واحد آلفا و بتا تشکیل شده است. زیر واحد آلفا در هورمون های LH، FSH، TSH و hCG یکسان است، ولی زیر واحد بتا در ساختار هر هورمون متفاوت است و نقش اصلی را در عملکرد بیولوژیک این هورمون ایفا می نماید. اهمیت اندازه گیری هورمون LH در بررسی و تنظیم باروری افراد از طریق محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-غدد جنسی به خوبی مشخص شده است. میزان هورمون LH در زمان کودکی بسیار کم است ولی پس از بلوغ افزایش می یابد. به این ترتیب بررسی سطح سرمی این هورمون تشخیص بلوغ زودرس دختران، و سندرم تخمدان پلی کیستیک اهمیت دارد. حیطة کاربرد این کیت اندازه گیری کمی هورمون LH در سرم انسان می باشد.

اصول آزمایش:

اساس این آزمایش الایزای ساندویچ می باشد. در این آزمایش، بی حرکت سازی در سطح چاهک ها توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در سطح چاهک و آنتی بادی بیوتینیل ه مونوکلونال ضد LH صورت می گیرد. با مخلوط شدن آنتی بادی مونوکلونال بیوتینیل ه شده، آنتی بادی متصل به آنزیم و سرم حاوی آنتی ژن، واکنش بین آنتی بادی ها و آنتی ژن سرم بدون هیچ رقابتی صورت می گیرد و کمپلکس های ساندویچ به دلیل تمایل بسیار بالای بین استرپتاویدین و بیوتین، به سطح پلیت متصل می شوند. پس شستشوی چاهک ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) به چاهک ها و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی تولید می شود که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. میزان رنگ ایجاد شده و در نتیجه شدت جذب نوری، با غلظت LH سرم ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت LH در نمونه ها، توسط منحنی استاندارد محاسبه می گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکرو پلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
- ۲) کالیبراتورها (LH Cal A-F): شش ویال با غلظت های ۰، ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mIU/mL. تهیه شده از سرم انسان.
- ۳) محلول کونژوگه آنزیمی (LH Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی لیتری حاوی آنتی بادی متصل به بیوتین و آنتی بادی متصل به آنزیم HRP.
- ۴) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی لیتری.
- ۵) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی لیتری.
- ۶) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی لیتری.
- ۷) محلول متوقف کننده واکنش (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری.
- ۸) محلول کنترل (LH Control): ویال (های) ۰/۵ میلی لیتری
- ۹) بر چسب 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 شده است.

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

- 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 کنید.
- 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 محلول ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- ۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBs Ag.

HIV1/2 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 در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل های ایمنی انجام شود.

۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. 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 کنید.

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) برای این آزمایش از نمونه های سرم استفاده کنید. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه گیری در درستی نتایج به دست آمده تأثیرگذار 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. نمونه ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و حداکثر تا یک ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه ها خودداری کنید.

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.

۲) آماده سازی محلول رنگزا: قبل از شروع استفاده از کیت، کل حجم محلول رنگزا B (ویال روشن) را داخل محلول رنگزا A (ویال تیره) خالی نمایید و برای انجام تست تا پایان مصرف کیت استفاده نمایید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت 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 تست را بردارید و بقیه چاهک ها را همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید.

۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل 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 ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴) چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات پلیت را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید و چاهک ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت گیر بزنید. به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت اقدام کنید.

۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده مصرف (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه بفرمایید) درون تمام چاهک ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

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

علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

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

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، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین دوز ماده اضافه شده به دوز LH مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب ارزیابی شد. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده 10 ± 100 درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Analyte	Cross Reactivity	Concentration
LH	1	-
β - LH subunit	1.08	-
FSH	<0.0001	1000 ng/mL
TSH	<0.0001	1000 ng/mL
hCG	<0.0001	1000 ng/mL

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 0.1 mIU/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)

۷) بررسی اثر هوک (Hook Effect)

غلظت LH تا 2300 mIU/mL بررسی گردید و اثر هوک مشاهده نشد.

۸) 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.

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

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 $\text{CV} < 11.5\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean LH (mIU/mL)	8.16	26.81	65.34
SD (mIU/mL)	0.41	1.31	3.1
CV (%)	5	4.9	4.7

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 $\text{CV} < 11.5\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean LH (mIU/mL)	11.08	24.63	58.13
SD (mIU/mL)	0.74	1.34	2.82
CV (%)	6.7	5.4	4.8

۳) بررسی درستی-آزمون بازایی (Recovery)

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

No.	Sample (mIU/mL)	Added (mIU/mL)	Exp. (mIU/mL)	Obs. (mIU/mL)	%Rec.
1	12.41	4.23	8.32	8.50	102.2
2	8.90	14.33	11.61	11.46	98.7
3	27.54	19.91	23.72	22.81	96.2

۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)

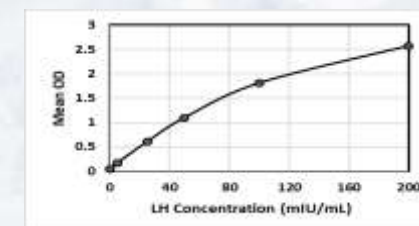
در این تست، غلظت LH در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $\text{Bias} < 10\%$ است.

No.	Sample (mIU/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	1.81	-1.8	0.3	-1.2	-1.6
2	12.90	-2.6	-0.4	-2.9	-2.1
3	23.13	-0.6	-2.8	-1.8	-2.5

۷) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

۸) مقدار جذب نوری را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج فرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (mIU/mL)
Cal. A	A1	0.042	0.043	0
	B1	0.044		
Cal. B	C1	0.164	0.165	5
	D1	0.166		
Cal. C	E1	0.602	0.604	25
	F1	0.606		
Cal. D	G1	1.102	1.098	50
	H1	1.095		
Cal. E	A2	1.825	1.811	100
	B2	1.798		
Cal. F	C2	2.565	2.574	200
	D2	2.584		



مقادیر مورد انتظار برای تست LH به روش الایزا

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

Males	
< 18 years	0.4 – 9.8
> 18 years	1.3 – 9.6
Females	
< 18 years	0.4 – 41.7
Premenopausal Follicular	1.9 – 14.6
Premenopausal Midcycle	12.2 – 118.0
Premenopausal Luteal	0.7 – 12.9
Postmenopausal	5.3 – 65.4