

MONOKIT

کیت اندازه‌گیری هورمون LH در سرم
LH ELISA Kit 96t
Cat. No: 0234-96 / Rev: B1 (1403/03/05)

مقدمه:

هورمون LH یک هورمون گلیکوپروتئینی است که توسط گنادوتروپ‌ها در لوب قدامی غده هیپوفیز سنتز و ترشح می‌شود. این هورمون همانند TSH، FSH و hCG از دو زیر واحد آلفا و بتا تشکیل شده است. زیر واحد آلفا در هورمون‌های 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 می‌نماید. اهمیت اندازه‌گیری هورمون LH در بررسی و تنظیم باروری افراد از طریق محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-غده جنسی به‌خوبی مشخص شده است. میزان هورمون LH در زمان کودکی بسیار کم است ولی پس از بلوغ افزایش می‌یابد. به این ترتیب بررسی سطح سرمی این هورمون تشخیص بلوغ زودرس دختران، و سندرم تخمدان پلی‌کیستیک اهمیت دارد. حیطة کاربرد این کیت، اندازه‌گیری کمی هورمون LH در سرم انسان می‌باشد.

اصول آزمایش:

اساس این آزمایش الایزای ساندویچ می‌باشد. در این آزمایش، بی‌حرکت سازی در سطح چاهک‌ها توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در سطح چاهک و آنتی‌بادی بیوتینیل‌ه مونوکلونال ضد LH صورت می‌گیرد. با مخلوط شدن آنتی‌بادی مونوکلونال بیوتینیل‌ه شده، آنتی‌بادی متصل به آنزیم و سرم حاوی آنتی‌ژن، واکنش بین آنتی‌بادی‌ها و آنتی‌ژن سرم بدون هیچ رقابتی صورت می‌گیرد و کمپلکس‌های ساندویچ به دلیل تمایل بسیار بالای بین استرپتاویدین و بیوتین، به سطح پلیت متصل می‌شوند. پس شستشوی چاهک‌ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) به چاهک‌ها و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود 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 نمونه‌ها، توسط منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

۱) میکرو پلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
۲) کالیبراتورها (LH Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های ۰، ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mIU/mL، تهیه شده از سرم انسان.
۳) محلول کونژوگه آنزیمی (LH Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی متصل به بیوتین و آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP.
۴) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.

۵) محلول رنگزای A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۶) محلول رنگزای B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۷) محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۸) محلول کنترل (LH Control) (ویال‌های) ۰/۵ میلی‌لیتری.
۹) بر چسب مخصوص پلیت یک ورق.
توجه ۱: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.
توجه ۲: مقادیر کنترل (ها) در برگه COA درج شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند:

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 نشود.
۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBS Ag، HIV1/2 و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های 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 جلوگیری کنید.
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.

جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

۱) برای این آزمایش از نمونه‌های سرم استفاده کنید. 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 گردد. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نشود.
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 ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا یک ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.

آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:

۱) آماده‌سازی 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.

۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزای A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزای A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزای B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. 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 نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، کنترل‌ها و نمونه‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت کنید.

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام تست را بردارید و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگه داری کنید.

۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه نمایید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید.

۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات پلیت را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید و چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) بشوید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت^۱ اقدام کنید.

۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت 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 به‌دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به‌مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

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).

¹ <http://www.samantajhiz.com/Support.aspx>

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
OBL	Own brand Labeling
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

۶) 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 $10 \pm 100\%$ 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

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 37°C درجه سانتی‌گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب

محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای 4°C درجه سانتی‌گراد.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در

دمای 4°C درجه سانتی‌گراد و ارزیابی نتایج به‌صورت 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.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean LH (mIU/mL)	7.55	28.62	48.34
S.D. (mIU/mL)	0.36	1.27	2.10
CV (%)	4.8	4.4	4.3

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

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدید پذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 11.5\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean LH (mIU/mL)	8.92	31.74	55.31
S.D. (mIU/mL)	0.54	1.79	2.66
CV (%)	6.0	5.6	4.8

۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء 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 تغییر کمتر از ۱۰ درصد نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (mIU/mL)	Added (mIU/mL)	Exp. (mIU/mL)	Obs. (mIU/mL)	%Rec.
1	14.31	9.22	11.76	12.13	103.1
2	11.83	25.90	18.86	18.42	97.7
3	64.30	49.71	57.00	55.33	97.1

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	6.42	-1.2	-2.3	-0.2	-2.6
2	17.30	-3.1	-1.0	-2.4	-0.1
3	24.73	3.4	-1.8	2.2	-2.0

۵) 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 0.1 mIU/mL تعیین گردید.

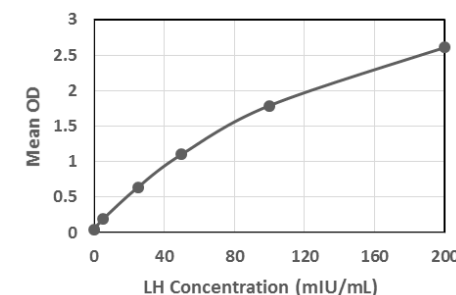
$$\text{LOD} = \text{LOB} + 1.645 \text{ SD}_s$$

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

(s: Diluted sample & b: Blank)

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	0.045	0.048	0
	B1	0.051		
Cal. B	C1	0.181	0.188	5
	D1	0.195		
	E1	0.628		
Cal. C	F1	0.652	0.640	25
	G1	1.086		
Cal. D	H1	1.122	1.104	50
	A2	1.762		
Cal. E	B2	1.818	1.790	100
	C2	2.565		
Cal. F	D2	2.645	2.605	200



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.

Reference Interval (mIU/mL)	
Follicular Phase (Females)	0.5 – 10.5
Midcycle Peak (Females)	18.4 – 61.2
Luteal Phase (Females)	0.5 – 10.5
Postmenopausal (Females)	8.2 – 40.8
Males	0.7 – 7.4

پارامترهای کنترل کیفی

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

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرار پذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 11.5\%$ است.

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.