

کیت سنجش LH به روش الایزا

مقدمه :

LH هورمونی گلیکوپروتئینی است که از سلولهای بازوفیلیک بخش قدامی غده هیپوفیز ترشح می شود. ترشح LH توسط هورمون آزاد کننده (GnRH) که از هیپوتالاموس ترشح می شود تحریک می گردد. از طرف دیگر هورمونهای استروئیدی و مهاری (Inhibin) اثرات فیدبک منفی و مثبت بر عملکرد LH دارند. ترشح LH دارای یک الگوی نوسانی میباشد که در خانمها نسبت به آقایان با وضوح بیشتری قابل مشاهده است. در خانمها در دوره عادت ماهانه غلظت LH دارای تغییراتی است بدین ترتیب که در آغاز عادت ماهانه (فاز فولیکولار) و در انتهای آن (فاز لوتئال) غلظت این هورمون پایین است. با افزایش LH در اواسط دوره عادت ماهانه عمل تخمک گذاری (اوولاسیون) صورت می پذیرد. در خانمهای یائسه به علت فقدان وجود اثر مهاری هورمونهای استروئیدی مترشح از تخمدان مقدار LH افزایش می یابد. در آقایان هورمون LH با اثر بر سلولهای لایدیگ بیضه باعث تحریک ساخته شدن تستوسترون می شود که وجود تستوسترون برای عمل اسپرماتوژنز ضروری است. در اطفال میزان LH پایین بوده و تا قبل از سن بلوغ دارای تغییراتی نمی باشد. سنجش LH در خانمها جهت بررسی اختلالات عادت ماهانه، آمنوره اولیه و ثانویه، هیپرستیزم و ویریلیزم بکار می رود. افزایش ناگهانی LH در آقایان در موارد ناباروری، هیپوگنادیسم، ژنیکوماستیا جهت بررسی عملکرد غدد هیپوتالاموس و هیپوفیز حائز اهمیت می باشد. کیت حاضر قابلیت اندازه گیری و تیتراسیون هورمون LH را با اختصاصیت و حساسیت بسیار بالا دارا می باشد.

اساس آزمایش :

اساس این کیت به روش ساندویچ و با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادهایی علیه یک شاخص آنتی ژنیک مولکول HRP پوشش داده میشوند (Coating). نمونه بیماران با آنتی بادی پوشش داده شده در ته چاهکها مجاور می شود. سپس آنتی بادی ثانویه ضد LH متصل به آنزیم HRP به چاهکها اضافه می شود. مقدار کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها با غلظت LH در نمونه ها متناسب است. پس از شستشو، محلول رنگزا که محتوی هیدروژن پراکسید (H2O2) و کروموژن است، داخل چاهکها ریخته می شود که رنگ آبی پدید آمده با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها متناسب است. با افزودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد.

محتویات کیت :

- ۱) پلیت ۹۶ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد LH (Anti - LH Coated Plate).
- ۲) محلول آنزیم کنژوگه (LH Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف).
- ۳) سری استانداردها (Standards Set) : شامل ۶ ویال استاندارد با غلظتهای صفر، ۲/۵، ۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ IU/L از LH کالیبره شده بر مبنای WHO 2nd IS 80/552 (استاندارد صفر حاوی ۲ میلی لیتر و سایر استانداردها حاوی ۱ میلی لیتر می باشند).
- ۴) سرم کنترل (Control Serum) : یک ویال حاوی ۱ میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال.
- ۵) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen - Substrate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف).
- ۶) محلول شستشو (Wash Solution) : یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۲۰X). جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید.
- ۷) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر اسید کلریدریک ۱ نرمال.
- ۸) برچسب مخصوص پلیت.

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

- ۱) دستگاه الایزایدر با طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس).
- ۲) سمپلر های ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر دقیق.
- ۳) آب مقطر.

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

- ۱) محتویات این کیت برای مصرف در همین کیت طراحی شده است.
- ۲) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید.

۱

تهران، شهرک گلستان، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳

تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷

www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com sms 300071402

ویرایش پنجم - اردیبهشت ۹۲



۳) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg و آنتی بادی های ضد HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند جهت احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند .

شرایط نگهداری :

- ۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید .
- ۲) چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید .
- ۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد .
- ۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۸-۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد .

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم را می توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود، نمونه می تواند برای مدت دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود ولی برای نگهداری بیش از مدت دو روز باید از دمای ۲۰- درجه سانتی گراد استفاده گردد .

توضیحات عمومی :

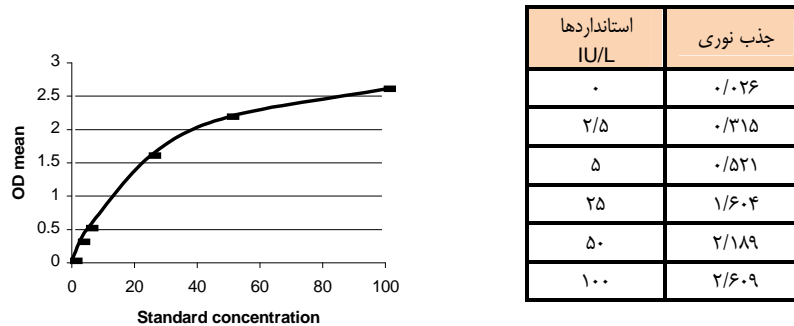
- ۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق برسانید .
- ۲) بهتر است به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند .
- ۳) از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید .
- ۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده جذب نوری چاهک ها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .
- ۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند .
- ۶) در هنگام سمپلینگ تمام محلولها و نمونه ها را وسط چاهکها بریزید .
- ۷) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب ، زمان انکوباسیون مناسب می باشد . بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب محلولهای مورد نیاز را باز کنید ، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیقتر می شود .
- ۸) به دلیل مشابه در بند ۷ بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه ها بیش از ۵ دقیقه بطول نیانجامد .

مراحل انجام آزمایش :

- ۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب نموده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .
- ۲) ۵۰ میکرولیتر از هر استاندارد ، سرم کنترل و نمونه را داخل هر چاهک بریزید . پیشنهاد می گردد که از استانداردها و نمونه ها بصورت داپلیکیت استفاده شود بدین معنی که هر استاندارد و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید .
- ۳) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) را به هر چاهک اضافه نموده و پلیت را به آرامی به مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات آن به خوبی مخلوط شوند .
- ۴) درب چاهکها را با برس مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۸ - ۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید .
- ۵) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (برای شستشو می توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد. در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو چاهکها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند) .
- ۶) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen - Substrate) به هر چاهک اضافه نمایید .
- ۷) چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید .
- ۸) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید . برای سنجش جذب نوری از دستگاه الیزاریدر یا فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نمایید (توصیه می شود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد) .

از هر دستگاه الیزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm میتوان استفاده نمود .

- ۱) جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الیزاریدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید .
- ۲) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آنها نموداری (Point to Point) رسم کنید به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آنها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد بدست آورید ، سپس نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی بدست آید .
- ۳) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن را پیدا کنید ، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید بطوریکه این خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و بعد از محل تلاقی خط و منحنی ، خطی عمود بر محور افقی وارد کنید نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد .



توجه : جذبهای نوری و منحنی مربوطه فقط به عنوان نمونه می باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید .

مقادیر مورد انتظار :

مقادیر نرمال LH در سرم افراد طبیعی که توسط تستهای مکرر به روش الایزا بدست آمده به قرار زیر می باشد ولی پیشنهاد می گردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد :

میانگین رنج طبیعی (IU/L)	رنج طبیعی (IU/L)	
۶	۱ - ۱۱	خانمهای نرمال قبل از یائسگی :
۳۴	۱۰ - ۸۰	در فاز فولیکولار
۷	۱ - ۱۴	در اواسط دوره عادت ماهانه
۲۴	۸/۱ - ۴۴	در فاز لوتئال
۴/۸	۱/۲ - ۸/۶	خانمهای یائسه
		مردان زیر ۶۰ سال

شاخصهای اجرایی :

۱) حداقل مقدار قابل اندازه گیری :

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت LH قابل تشخیص در این کیت ۱ IU/L می باشد .

۲) دقت آزمایش :

آزمایشهای اینترا - اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و اینتر - اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایشات مختلف) با استفاده از ۳ سرم با غلظتهای مختلف hLH انجام گردید که در جداول ۱ و ۲ آمده است :

جدول شماره ۱ (اینتر- اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (IU/L)	SD	CV (%)
۱	۲۴	۶/۱	۰/۳	۴/۹
۲	۲۴	۲۲	۱	۴/۵
۳	۲۴	۵۵	۲/۴	۴/۴

جدول شماره ۲ (اینتر- اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (IU/L)	SD	CV (%)
۱	۱۰	۵/۷	۰/۴	۷
۲	۱۰	۲۰/۸	۰/۹	۴/۳
۳	۱۰	۵۴/۷	۳/۸	۶/۹

هر سری آزمایش بصورت Duplicate انجام شده است .

۳) ریکاوری آزمایش :

مقادیر معلومی از hLH به ۴ سرم با غلظتهای مشخص hLH افزوده شد و ریکاوری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول زیر آمده است :

نمونه	مقدار hLH موجود در سرم (IU/L)	مقدار افزوده شده hLH (IU/L)	مقدار مورد انتظار (IU/L)	مقدار بدست آمده (IU/L)	ریکاوری (%)
۱	۱۲	۵	۸/۵	۸	۹۴
۱	۱۲	۲۵	۱۸/۵	۱۹/۵	۱۰۵
۱	۱۲	۵۰	۳۱	۳۰	۹۷
۲	۲۹	۵	۱۷	۱۸/۵	۱۰۹
۲	۲۹	۲۵	۲۷	۲۶	۹۶
۲	۲۹	۵۰	۳۹/۵	۴۱	۱۰۴
۳	۴۴	۵	۲۴/۵	۲۵/۵	۱۰۴
۳	۴۴	۲۵	۳۴/۵	۳۳	۹۶
۳	۴۴	۵۰	۴۷	۴۹	۱۰۴
۴	۶۲	۵	۳۳/۵	۳۴	۱۰۱
۴	۶۲	۲۵	۴۳/۵	۴۱/۵	۹۵
۴	۶۲	۵۰	۵۶	۵۸	۱۰۴

(خطی بودن آزمایش :

به کمک استاندارد صفر رفته‌های متوالی ۶ نمونه سرم با غلظت مشخص از hLH تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت محاسبه شد که در جدول زیر نتایج آن آورده شده است .

ریکاوری (%)				مقدار hLH موجود در سرم رقیق نشده (IU/L)	نمونه
رقت ۱/۱۶	رقت ۱/۸	رقت ۱/۴	رقت ۱/۲		
-	۹۹	۱۰۴	۹۸	۸/۵	۱
۹۷	۹۵	۱۰۲	۹۹	۲۴	۲
۹۴	۱۰۴	۹۶	۱۰۰	۳۲	۳
۹۷	۱۰۳	۹۴	۹۸	۳۹	۴
۹۶	۹۵	۱۰۷	۱۰۱	۴۸	۵
۹۸	۱۰۰	۹۸	۹۶	۸۷	۶

(۵) اختصاصیت آزمایش :

اختصاصیت این آزمایش به کمک سرمه‌هایی با غلظتهای مختلف hTSH , hFSH و hCG جهت بررسی واکنشهای متقاطع با hLH بررسی شد که نتایج آن در جدول زیر آمده است :

غلظت ظاهری hLH (IU/L)	غلظت	آنالیت
< ۱	۵۰۰	hFSH (IU/L)
	۲۵۰	
	۱۰۰	
	۵۰	
< ۱	۵۰۰	hTSH (mIU/L)
	۲۵۰	
	۱۰۰	
	۵۰	
< ۱	۱۰۰۰۰۰	hCG (IU/L)
	۱۰۰۰۰	
	۱۰۰۰	
	۱۰۰	

(اثر هوک (Hook Effect) :

آزمایش hLH جهت سرمه‌هایی با غلظت بسیار بالا از این آنالیت (تا ۲۵۰۰ IU/L) صورت گرفت که پدیده هوک مشاهده نشد .

Reference :

Wide L. Human pituitary gonadotropins. In : Loraine JA , Bell ET I eds, Hormone assays and their clinical application . 4th, Edinburgh , London and New York : Churchill Livingstone , 1976 : 78-140 .

روش انجام آزمایش LH بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی بادی ضد LH			
نمونه	سرم کنترل	استانداردها	محلولها
-	-	۵۰ میکرولیتر	استانداردها
-	۵۰ میکرولیتر	-	سرم کنترل
۵۰ میکرولیتر	-	-	نمونه
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	آنزیم کنژوگه
پلیت را به ملایمت به مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهک ها به خوبی مخلوط شوند و سپس دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید . برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید . طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .			
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	محلول رنگزا
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید .			
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	محلول متوقف کننده
جذب نوری چاهکها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر فرانس) قرائت کنید .			