

MONOKIT

اندازه‌گیری هورمون Estradiol در سرم انسان
Estradiol ELISA kit 96t
Cat. No: 2834-96 / Rev: A1 (1402/09/25)

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 زن نامی، بلوغ زودرس، هیپرتریوئیدیسم 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 الایزا است.

اصول آزمایش:

این آزمایش بر اساس الایزای 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 غیرکونژوگه هستند به‌همراه 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 متوقف کننده، 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 محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

(۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.

(۲) کالیبراتورها (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 میلی‌لیتری.

(۹) برچسب مخصوص پلیت: یک ورق.

توجه ۱: تمام محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.

توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در برگه COA درج شده 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 نشود.

(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 جلوگیری نمایید.

(۶) نمونه بیمار، 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) نمونه مناسب برای این تست سرم یا پلاسما هپارینه است. ناشتا بودن فرد به هنگام 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 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. 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) 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 نمایید.

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 به‌آرامی یکنواخت کنید

(۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک‌ها را به‌همراه 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 و یا کنترل 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 به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

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

(۵) حجم ۵۰ میکرولیتر کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

(۶) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

(۷) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا آسپیراسیون تخلیه کنید سپس 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 به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت اقدام نمایید.

(۸) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری نمایید.









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

(۹) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت 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 و 4PL (یا Logic-log) قابل اجرا است؛ در صورت استفاده از روش 4PL غلظت کالیبراتور A را عددی کوچک (به عنوان مثال 0.01 pg/mL) در نظر بگیرید. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

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

علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

	Manufacture
	Use-by date
	Batch code
	In vitro diagnostic medical device
	Own brand Labeling
	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 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 10 ± 1.0 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.

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

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

(s: Diluted sample & b: Blank)

۷) بررسی 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 مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به

تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

پارامترهای کنترل کیفیت

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)	36.31	125.23	200.15
SD (pg/mL)	1.96	5.55	7.21
CV (%)	5.3	4.4	3.6

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 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)	22.32	104.17	212.14
SD (pg/mL)	1.21	5.54	9.21
CV (%)	5.4	5.3	4.3

۳) بررسی درستی از طریق آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش 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.

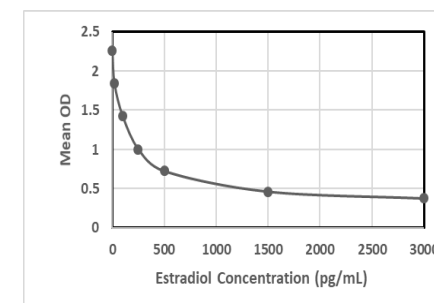
No.	Sample (pg/mL)	Added (pg/mL)	Exp. (pg/mL)	Obs. (pg/mL)	% Rec.
1	27.01	12.88	19.94	19.51	97.8
2	12.21	51.11	31.66	31.85	100.6
3	54.32	28.33	41.32	40.67	98.4

۴) بررسی درستی از طریق 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، $\text{Bias} < 10\%$ است.

No.	Sample (pg/mL)	% Bias			
		1/2	1/4	1/8	1/16
1	131.09	3.1	2.8	-1.9	-1.6
2	146.36	3.2	-2.3	-1.5	-3.9
3	165.12	-1.8	2.2	-2.4	-2.6

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (pg/mL)
Cal. A	A1	2.233	2.242	0
	B1	2.251		
Cal. B	C1	1.791	1.796	20
	D1	1.801		
Cal. C	E1	1.416	1.418	100
	F1	1.420		
Cal. D	G1	1.112	1.062	250
	H1	1.012		
Cal. E	A2	0.763	0.756	500
	B2	0.749		
Cal. F	C2	0.485	0.478	1500
	D2	0.471		
Cal. G	E2	0.382	0.386	3000
	F2	0.389		



مقادیر مورد انتظار برای تست الیزای استرادیول

شرکت تولیدکننده 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.

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