دیاپلاس

DIAPLUS

DiaPlus

کیت سنجش LH به روش الایزا

Brochure Rev: C1 (1403/05/15)

REF 0244-96

اهمیت بالینی

هورمون لوتئینیزه کننده (LH) گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی تقریباً ۳۰۰۰۰ دالتون است که در مردان و زنان از غده هیپوفیز قدامی در پاسخ به هورمون آزادکننده گنادوتروپین ترشح می‌شود. این هورمون دارای دو زیر واحد آلفا و بتا می‌باشد که زیرواحد بتا نقش اصلی در عملکرد بیولوژیک این هورمون دارد. میزان ترشح هورمون LH بعد از بلوغ افزایش می‌یابد و در بیضه‌ها، با اتصال به رسپتورهای خود بر روی سلولهای لیدیگ باعث تحریک سنتز و ترشح تستوسترون می‌شود. در تخمدان‌ها، LH باعث تحریک ترشح استروژن و تخمک‌گذاری می‌گردد. اندازه‌گیری میزان هورمون LH در بررسی باروری افراد از طریق محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- غدد جنسی و همچنین تشخیص بلوغ زودرس دختران و سندرم تخمدان پلی‌کیستیک دارای اهمیت می‌باشد. حیطه کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی هورمون LH در سرم انسان می‌باشد.

اصول آزمایش

اساس آزمایش در این کیت الایزای ساندویچ می‌باشد. با مخلوط شدن آنتی‌بادی مونوکلونال بیوتینیله شده، آنتی‌بادی متصل به آنزیم و سرم حاوی آنتی‌ژن، واکنش بین آنتی‌بادی‌ها و آنتی‌ژن سرم، منجربه تشکیل کمپلکسی می‌گردد که به‌دلیل تمایل بالای بیوتین به استرپتاویدین تثبیت شده به کف چاهک متصل می‌شود. پس از شستشوی چاهک‌ها، با اضافه کردن محلول سوبسترای آنزیم HRP، رنگ آبی تشکیل شده که با افزودن محلول متوقف‌کننده تبدیل به رنگ زرد می‌گردد. محصول نهایی تولید شده 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) کالیبراتورها (Calibrators) :

شامل ۶ ویال کالیبراتور با غلظت‌های ۰، ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ (mIU/ml).

نکته : کالیبراتورها بر پایه سرم انسانی تهیه شده.

۲) محلول آنزیم کونژوگه (LH Enzyme Conjugate) ۱۱ میلی‌لیتر:

یک ویال شامل محلول آنتی‌بادی نشان‌دار شده با آنزیم و آنتی‌بادی بیوتینیله شده.

۳) پلیت ۹۶ تستی:

یک پلیت حاوی استرپتاویدین تثبیت شده که به‌همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی بسته‌بندی شده است.

۴) محلول شستشو غلیظ (Wash Buffer-50X) ۲۰ میلی‌لیتر:

یک ویال شامل سورفاکتانت محلول شده در بافر فسفات.

۵) محلول سوبسترای A (Substrate A) ۶/۵ میلی‌لیتر:

یک ویال محلول تترا متیل بنزیدین (TMB).

۶) محلول سوبسترای B (Substrate B) ۶/۵ میلی‌لیتر:

یک ویال محلول هیدروژن پراکساید (H_2O_2).

۷) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution) ۱۲ میلی‌لیتر:

یک ویال حاوی محلول متوقف‌کننده واکنش.

۸) سرم کنترل (LH Control):

ویال(های) حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر سرم.

۹) برچسب پلیت:

یک ورق.

توجه ۱: کلیه اجزای کیت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود. محلول متوقف‌کننده را می‌توان در دمای اتاق نگهداری کرد.

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

KGS

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشد:

۱) دستگاه خوانش‌گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).

۲) سمپلر کالیبره.

۳) آب مقطر دیونیزه.

موارد احتیاط در استفاده از کیت

- این کیت برای انجام تست‌های تشخیصی در محیط‌های آزمایشگاهی کاربرد دارد. محتویات کیت منشاء سرم انسانی داشته و از نظر عدم وجود HBsAg و آنتی‌بادی‌های ضد HIV1/2 و HCV کنترل شده‌اند، اما از آنجا که هیچ روشی به‌طور صددرصد نمی‌تواند منفی بودن این موارد را تأیید نماید، بنابراین لازم است هنگام استفاده از کیت، مراقبت‌های لازم به عمل آورده شود.
- محتویات تعبیه شده در این کیت برای استفاده در همین سری ساخت بوده و از استفاده مشترک با سایر سری ساخت‌ها خودداری فرمایید.
- برای دریافت نتایج بهتر و دقیق‌تر فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ چاهک‌ها رعایت شود. این فاصله زمانی نباید به گونه ای باشد که منجر به اثر دریفت (drift) گردد. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل این نکته حائز اهمیت است. دقت نمایید محلول‌ها نزدیک به ته چاهک ریخته شوند.
- شستشوی نامناسب می‌تواند باعث بوجود آمدن نتایج اشتباه در آزمایش شود.
- کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از استفاده از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است خودداری نمایید.

جمع آوری و تهیه نمونه‌ها

- نمونه مورد استفاده در این آزمایش سرم می‌باشد که از خون سیاهرگی تهیه شده و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا می‌گردد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
- نگهداری سرم باید در لوله‌های در بسته انجام شود. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری می‌باشند و در صورت استفاده برای مدت زمان طولانی‌تر (حداکثر تا ۳۰ روز) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.
- در افرادی که دوز بالایی از بیوتین (>5 mg/day) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.

آماده سازی محلول‌ها

محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را با ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید. محلول آماده شده را 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.

محلول سوبسترا: محلول‌های سوبسترا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول سوبسترا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول سوبسترا B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول سوبسترا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

مراحل انجام تست

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کلیه ویال‌های کالیبراتور، نمونه و کنترل را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت نمایید.

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را جدا نموده و چاهک‌های باقی مانده را به همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده، درب آن را ببندید و در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌های بیمار و کنترل را در داخل چاهک‌های مورد نظر بریزید. پیشنهاد می‌شود از هر نمونه، کالیبراتور و یا کنترل به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود و از میانگین جذب نوری آنها استفاده شود.

DIAPLUS

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی به تمامی چاهک‌ها اضافه نمایید. پلیت را ۳۰-۲۰ ثانیه به‌آرامی روی سطح میز تکان دهید.

۴) پلیت را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک‌ها را در روش دستی با وارونه کردن پلیت و در روش دستگاهی با آسپیره کردن کاملاً تخلیه نمایید.

۶) چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده‌سازی محلول‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

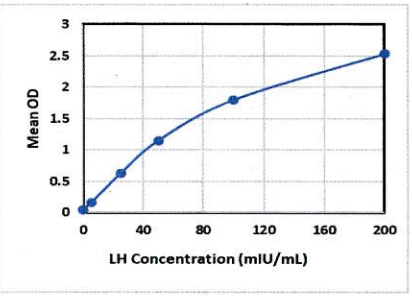
۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترای آماده‌شده (به بخش آماده‌سازی محلول‌ها مراجعه شود) به چاهک‌ها اضافه نمایید و با برچسب پلیت بپوشانید. سپس پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری فرمایید.

توجه: در صورتی که بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به‌دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به‌مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۸) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به چاهک‌ها اضافه نموده و به‌مدت ۲۰-۱۵ ثانیه به‌آرامی تکان دهید.

۹) جذب نوری چاهک‌ها را در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر با روش Point to Point کمتر از ۱۵ دقیقه بخوانید (ازطول‌موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ استفاده نمایید).

Calibrators	Well Number	Abs.	Mean Abs	Conc. (mIU/mL)
Cal. A	A1	0.044	0.046	0
	B1	0.048		
Cal. B	C1	0.151	0.156	5
	D1	0.162		
Cal. C	E1	0.621	0.63	25
	F1	0.639		
Cal. D	G1	0.991	1.05	50
	H1	1.11		
Cal. E	A2	1.801	1.796	100
	B2	1.792		
Cal. F	C2	2.515	2.531	200
	D2	2.548		



نکته: جذب نوری به دست آمده از کالیبراتورها و همچنین منحنی فوق فقط به‌عنوان مثال ذکر شده و در هر آزمایشگاهی در هر مرتبه آزمایش باید منحنی جدیدی ترسیم گردد.

مقادیر مورد انتظار

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

Normal Range (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

Intra – Assay

دقت‌داخلی با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش CV<11.5% است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean LH mIU/mL	8.76	27.6	65.3
SD (mIU/mL)	0.51	1.51	3.21
CV (%)	5.8	5.5	4.9

Inter – Assay

دقت بین‌تستی با ارزیابی نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با غلظت‌های متفاوت در چهار نوبت کاری (هر نوبت پنج بار تکرار) بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش CV<11.5% است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean LH mIU/mL	11.01	25.6	41.22
SD (mIU/mL)	0.74	1.44	2.24
CV (%)	6.7	5.6	5.4

Recovery

در این تست دو نمونه سرم به‌نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به‌عنوان یک نمونه، مقدار LH در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش Bias<10% است.

No.	Sample mIU/mL	Added mIU/mL	Exp. mIU/mL	Obs. mIU/mL	% Rec.
1	8.18	21.09	14.63	15.01	102.5
2	23.11	43.91	33.51	33.29	99.3
3	44.01	7.91	25.96	26.28	101.2

Linearity

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

No.	Sample mIU/mL	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	9.11	-3.2	1.8	2.4	-1.9
2	30.11	2.9	-2.4	-2.1	2.2
3	42.27	3.1	-2.6	2.4	1.6

Cross Reactivity

اختصاصیت این آزمایش با اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مداخله‌گر به سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین دوز ماده مداخله‌گر به دوز LH مورد نیاز برای همان مقدار جذب ارزیابی شد.

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

Sensitivity

بر اساس جمع میانگین جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت mIU/mL ۰/۱ می‌باشد.

Hook Effect

غلظت LH تا mIU/mL ۲۳۰۰ بررسی گردید و اثر هوک مشاهده نشد.

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.

منابع

1. Kosasa T.S., "Measurement of Human Luteinizing Hormone."*Journal of Reproductive Medicine,* 26 (1981) pg. 201-6.
2. Danzer H., Braunstein G.D., et al., "Maternal Serum Human Chorionic Gonadotropic Concentrations and Fetal Sex Predictions." Fertility and Sterility, 34 (1980) pg. 336-40.
3. Braunstein G.D., et at., "Serum Human Luteinizing Hormone Levels through Normal Pregnancy ", *American Journal of Obstetrics and Gynecology,* 126 (1976) pg. 678-81.
4. Goldstein D.P., and Kosasa T.S., "The Subunit Radioimmunoassay for LH Clinical Application." *Gynecology,* 6 (1975) pg. 145-84.
5. Batzer F. "Hormonal Evaluation of Early Pregnancy", *Fertility and Sterility,* 34 (1980) pg. 1-12.
6. Braunstein, G.D., et al., "First-Trimester Luteinizing Hormone Measurements as an Aid to the Diagnosis of Early Pregnancy Disorders", *American Journal* of *Obstetrics and Gynecology,* 131 (1978) pg. 25-32.
7. Lenton E., Neal L. and Sulaiman R., "Plasma Concentrations of Human Gonadotropin from the time of Implantation until the Second Week of Pregnancy ", *Fertility and Sterility,* 37 (1982) pg. 773-78.

در صورت بروز هرگونه مشکل با بخش پشتیبانی شرکت تینا پژوهان آروین تماس حاصل فرمایید.

IVD

DIAPLUS
شرکت تینا پژوهان آروین
سهروردی شمالی ، پایین تر از آپادانا،
کوچه فیروزه، پلاک ۳ واحد ۱ و ۲
تلفن: ۰۲۱-۴۱۷۹۶۰۰۰