راهنمای کیت LH

مقدمه:

ساختمان ومتابولیسم : هورمونهای گلیکو پروتئینی مترشحه از هیپوفیز از دو زنجیره پپتیدی تشکیل شده اند α-subunit که از 89 اسید آمینه تشکیل شده و ساختمانی مشابه GH,TSH,FSH دارد و β-subunit مسئول فعالیت ایمونولوژیک داخل سلولیست. LH از سلولهای بازوفیل هیپوفیز قدامی ترشح می شود. ترشح بالا و پائین این هورمون در حقیقت بستگی به تیتر استروئیدهای در گردش با مکانیسم فیدبک منفی دارد.

این هورمون گنادو تروپیک هیپوفیز قدامی با وزن مولکولی 32000 دالتون شامل 15-30% کربوئیدرات می باشد که شامل فروکتوز،مانوز،گالاکتوز،گلوکز آمین و اسید سیالیک می باشد. α-Subunit ها در آمینو اسید ها متفاوتند. α-Subunit ایزوله شده فعالیت بیولوژیکی را سبب می شود و β-Subunit ایزوله ممکن است فعالیت بیولوژیکی کمی داشته باشد اما زمانی که این دو با هم ترکیب میشوند فعالیت به حد اکثر می رسد. حضور α و β برای پاسخ بیولوژیکی حائز اهمیت است. آنتی سرم اختصاصی برای β-Subunit اساس روش های ایمونولوژیک را رهبری می کند.

معرفی آزمایش ،کاربرد بالینی :

در سندرم ترنر (Turnur) برداشت تخمدانها ودر مردان برداشت بیضه ها و Agenesis آنورکیسم (فقدان بیضه) و بلوغ دیررس افزایش LH دیده می شود. در حاملگی ،نقص هیپوتالاموس، PCOD، تخمدان سازنده کیست، هموکروماتوز و آنمی داسی شکل افزایش LH دیده می شود.

در خانم های یائسه به علت فقدان اثر مهاری هورمونهای استروئیدی مترشحه از تخمدان مقدار LH به صورت قابل ملاحظه ای افزایش می یابد.در مردان LH با اثر بر سلولهای لایدیک بیضه باعث تحریک ساخته شدن تستسترون می شود. در اطفال میزان LH پائین می باشدو تا قبل از سن بلوغ میزان آن تغییراتی نمی کند. سنجش LH در آقایان در موارد نا باروری، هیپوگنادیسم ژنیکوماستیا جهت بررسی عملکرد غدد هیپوتالاموس و هیپوفیز حائز اهمیت می باشد.

محدوده طبیعی:

مقادیر نرمال LH در سرم افراد طبیعي که توسط تست هاي مکرر به روش الایزا بدست آمده در بانوان باردار بسته به هفته بارداری به شرح زیر می باشد ولي پیشنهاد مي گردد تا هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد:

زنان	mIu/ml یا Iu/L
فاز فولیکولار	12.5-1.9
فاز لوتئال	17-0.5
پیک تخمک گذاری	80-8.7
پس از یائسگی	52.3-5
مردان بالغ زیر 60 سال	9.3-1.5
قبل از بلوغ	0.3-.-3.9
در حین بلوغ (11-15 سال)	13.4-5

اساس آزمایش :

اساس این کیت به روش ساندویچ الایزا می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادی منوکلونال بر علیه یک واحد آنتی ژنیک LH , Coat میشوند. نمونه بیماران با آنتی بادی Coat شده در چاهکها مجاور می شود، سپس آنتی بادی ثانویه متصل به آنزیم HRP به چاهکها اضافه می شود که باعث ایجاد یک کمپلکس ایمنی می شود که نشانگر غلظت LH در نمونه ها می باشد. در ادامه پس از شستشو ، محلول رنگزا که حاوی H2O2 و کروموژن است به داخل چاهکها ریخته میشود و تولید رنگ آبی می کند که رنگ آبی تولید شده متناسب با کمپلکس ایمنی ایجاد شده در چاهکها می باشد. با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل میشود که بهترین جذب نوری را در طول موج 450 نانومتر دارد.

جمع آوري و أماده سازي نمونه :

سرم غیر همولیز و غیر لیپمیک وغیر ایکتریک که تا 8 روز در دمای اتاق و 2 هفته در یخچال و به مدت بیشتر در 20- پایدار است. بخاطر سیکلیک بودن وتغییرات پریودیک گونادوتروپین ،بهتر است در چند سری اندازه گیری انجام شود.

واکنش تداخلی:

سایمتدین ،کلومیفن فلوودوپا باعث افزایش و کورتیکواستروئیدها ،مگسترول ،فنوتیازین ها ،استانوزولول و قرص ضد بارداری باعث کاهش در نتیجه آزمایش می شوند.

محتویات کیت :

1- یک عدد پلیت حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد LH (Anti -LH Coated Plate) دارای 96 چاهک.
2- سری استاندارد (Standard Set) : 6 ویال استاندارد دارای غلظت های IU/L صفر، 2.5،10، 20، 50، 100 که هر ویال محتوی 1 میلی لیتر می باشد.
3- سرم کنترل (Control Serum) : یک ویال حاوی 1 میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص نوشته شده روی برچسب ویال
4- محلول رقیق کننده نمونه ها (Sample Diluent) : یک ویال حاوی 1 میلی لیتر برای رقیق کردن نمونه هائی که غلظت بالاتری از بالاترین استاندارد کیت را دارا می باشند.
5- محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی 6 میلی لیتر محلول حاوی LH کنژوکه شده با HRP .
6- محلول شستشو (Washing Solution) : یک ویال حاوی 40 میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (25 X) که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف مقدار لازم از محلول شستشوی غلیظ را به نسبت 1/25 با آب مقطر رقیق کنید.
7- محلول رنگزا (Chromogen Substrate) : یک ویال محتوی 12 میلی لیتر و آماده برای مصرف.
8- محلول متوقف کننده (Stop Solution) :یک ویال محتوی 12 میلی لیتر.
9- بر چسب مخصوص پلیت (Card Board Sealer)

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

1- دستگاه خوانش الایزا (Eliza Reader) دارای فیلتر 450 نانومتر ودر صورت امکان 630 به عنوان فیلتر رفرانس.
2- سمپلر های 50 و 100 میکرولیتر دقیق
3- آب مقطر

نكات قابل ذكر براي مصرف كنندگان :

1- محتويات اين كيت براي مصرف در همين كيت مي باشد .
2- از مخلوط كردن محتويات كيتها باشماره ساختهاي مختلف جدا" خودداري نمائيد .
3- كليه مواد موجود در كيت كه منشاء سرمي دارند از نظر وجود HIV,HCV, HBs AG كنترل گرديده اند و فاقد اين عوامل مي باشند . جهت احتياط بهتراست هر كاربري كه با كيت كار مي كند از تماس مستقيم با مواد بپرهيزد .

توضيحات عمومي:

1- قبل از شروع مراحل آزمايش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق رسانده و به خوبي تكان دهيد تا كاملا" يكنواخت شوند.
2- بهتراست به محض شروع آزمايش كليه مراحل بدون توقف انجام پذيرند .
3- ازنوك سمپلر يك بار مصرف براي هر نمونه استفاده كنيد .
4- پس از افزودن محلول متوقف كننده ، جذب نوري چاهكها حداكثر تا نيم ساعت قابل قرائت مي باشد .
5- براي كسب نتايج مطلوب بايد شستشوي چاهكها بصورت كامل صورت گرفته وآخرين قطرات پس از شستشو از چاهكها تخليه شوند .
6- از مهمترين فاكتورها در حصول نتيجه مطلوب ، زمان انكو باسيون مناسب مي باشد ، بنابراين پيشنهاد مي گردد قبل از شروع آزمايش تمام مواد و محلولهاي مورد نيازرا آماده نموده و درب محلولهاي مورد نياز را باز كنيد ، اين عمل با كاهش فاصله زماني بين مراحل سمپلينگ باعث نتايج دقيقتري ميشود.
7- بهتر است كه حجم انجام تست محدود باشد وزمان ريختن نمونه ها بيش از2دقيقه به طول نيانجامد .

مراحل انجام آزمايش :

8- تعداد چاهكهاي مورد نظر را انتخاب نموده و باقي چاهكها را به همراه نمگير درون كيسه مخصوص نگهداري پليت قرار داده و درب آن را ببنديد .
9- 50 ميكروليتر از هر استاندارد ، سرم كنترل و نمونه را به داخل هر چاهك بريزيد ، سپس 100 ميكروليتر محلول آنزيم كونزوگه (Enzyme Conjugate) به هرچاهك اضافه نمائيد . پليت را به آرامي به مدت 15 ثانيه تكان دهيد تا محتويات آن بخوبي مخلوط شوند ، پيشنهاد مي گردد كه از استانداردها و نمونه ها به صورت داپليكيت استفاده شود بدين معني كه هر استاندارد و نمونه را در دوچاهك بريزيد و در انتها از ميانگين جذب نوري آنها براي محاسبه نتايج استفاده كنيد سپس چاهكها را به مدت 60 دقيقه در درجه حرارت اتاق (22-28 درجه سانتيگراد) انكوبه نمائيد .
10- محتويات چاهكها را خالي كرده و چاهكها را 5 بار با محلول شستشوي آماده مصرف بشوئيد (براي شستشو مي توان از سمپلر 8 كاناله استفاده نمود ولي بايد مواظب بود كه محلول شستشو از يك چاهك به چاهك ديگر وارد نشود زيرا مي تواند موجب ايجاد خطا در نتيجه آزمايش گردد). در هر دفعه شستشو حدود 300 ميكروليتر محلول شستشو در هر چاهك ريخته و سپس چاهك ها را درحالت وارونه و با ضربات ملايم بر روي يك پارچه يا كاغذ نمگير بكوبيد تا قطرات اضافي محلول شستشو خارج شوند.
11- 100 ميكروليتر محلول رنگزا (Chromogen – Substrate) به هرچاهك اضافه نمائيد و چاهكها را به مدت 15 دقيقه در درجه حرارت اتاق و درتاريكي انكوبه نمائيد .
12- با اضافه كردن 100 ميكروليتر محلول متوقف كننده (Stop Solution) به هرچاهك ادامه واكنشهاي آنزيمي را متوقف نمائيد . براي سنجش جذب نوري هرچاهك از دستگاه الايزا ريدر با فيلتر 450 nm استفاده نمائيد .(توصيه مي شود از فيلتر 630 nm به عنوان فيلتر رفرانس استفاده گردد.)

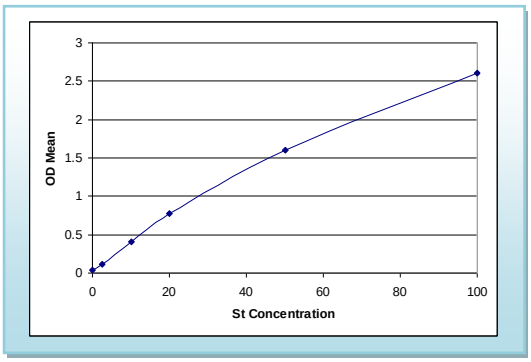
شرايط نگهداري فرآورده تشخيصي:

1- دماي نگهداري كيت بين 2-8 C' مي باشد و بهتراست كه در 4C ' نگهداري شود .
2- با توجه به انجام تست هاي accelerate , Full Term اين كيت درصورت رعايت موارد نگهداري صحيح تا 15 ماه پايدار مي باشد ودر اين مدت كيت حاضر بالاي 90 درصد كارايي اوليه را داراست.
3- درصورت بازشدن درب كيت و محلول ها تازماني كه آلودگي ميكروبي و قارچي رخ ندهد كيت پايدار خواهند بود.
4- چاهكها را در كيسه مخصوص پليت همراه با نمگير نگهداري نمائيد .

محاسبه نتايج :

1- جذب نوری استاندارد ها و نمونه ها را به کمک دستگاه Eliza Reader در طول موج nm450 و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس nm630 بخوانید.
2- با استفاده از میانگین جذب نوری استاندارد ها 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 ،در ادامه نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمائید تا منحنی بدست آید.

3- 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 نمائید بطوریکه این خط کاملا بر محور عمودی عمود باشد و در ادامه 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.



	استانداردها (IU/L)	جذب نوری
St 1	**0**	**0.04**
St 2	**2.5**	**0.12**
St 3	**10**	**0.41**
St 4	**20**	**0.78**
St 5	**50**	**1.6**
St 6	**100**	**2.6**

توجه : جذب های نوری و منحنی مربوط فقط به عنوان نمونه می باشند و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

شاخصهاي اجرائي:

1- حداقل مقدار قابل اندازه گيري :

براساس جذب نوري استاندارد صفر و سه برابر انحراف معيار (SD)حداقل غلظت LH قابل تشخيص در اين كيت 1.0 IU/L مي باشد .

2- دقت آزمايش :

آزمايشهاي اينترا- اسي (همخواني غلظت مشخص از يك نمونه در يك سري آزمايش) و اينتر- اسي (همخواني غلظت مشخص ازيك نمونه در سري آزمايشهاي مختلف) بااستفاده از 4 استاندارد با غلظتهاي مختلف LH انجام گرديد كه در جداول 1و2 آمده است .

جدول شماره 1 (اينترا- اسي)

نمونه	تعداد دفعات تكرار	ميانگين IU/L	SD IU/L	CV%
1	12	0/5	0/042	6/5
2	12	5	0/17	5/3
3	12	10	0/32	5/4
4	12	40	0/85	3/9

جدول شماره 2 (اينتر- اسي)

نمونه	تعداد دفعات تكرار	ميانگين IU/L	SD IU/L	CV%
1	5	0/5	0/049	9/4
2	5	5	0/16	5/2
3	5	10	0/39	6/6
4	5	40	0/94	4/5

هرسري آزمايش بصورت Duplicate انجام شده است .

3- خطي بودن آزمايش :

به كمك استاندارد صفر رقتهاي متوالي 4 نمونه سرم با غلظت مشخص از LH تهيه گرديد و نتايج بر اساس ضريب رقت محاسبه شد كه درجدول زير نتايج آن آورده شده است .

جدول خطي بودن :

نمونه	مقدار LH موجود در سرم رقيق نشده (mIU/L)	ريكاوري (%)			
		رقت 25%	رقت 50%	رقت 75%	100%
1	10	98	96	100	94
2	100	100	93	96	96
3	400	95	96	99	91

4- ريكاوري آزمايش :

مقادير معلومي از LH به 4 سرم با غلظتهاي مشخص LH افزوده شد و ريكاوري آنها محاسبه گرديد كه نتايج آن در جدول صفحه بعد آمده است .

جدول ريكاوري :

نمونه	مقدار LH موجود درسرم (IU/L)	مقدار افزوده شده LH (IU/L)	مقدار مورد انتظار (IU/L)	مقدار بدست آمده (IU/L)	ريكاوري (%)
1	15	25	20	19.3	96.5
1	15	200	107.5	105	97.6
1	15	800	407.5	414	101
2	84	25	54.5	50.3	92
2	84	200	142	133	93.6
2	84	800	442	431	97.5
3	275	25	150	144	96
3	275	200	237.5	211	88.8
3	275	800	537.5	545	101
4	650	25	337.5	320	94.8
4	650	200	425	440	103
4	650	800	725	702	96.8

5- اختصاصيت آزمايش :

اختصاصيت اين آزمايش به كمك سرمهايي با غلظتهاي مختلف human LH, human FSH, human TSH جهت بررسي واكنشهاي متقاطع با HCG بررسي شد كه نتايج آن در جدول زير آمده است .

جدول اختصاصيت (واكنش متقاطع) :

آناليت	غلظت	غلظت ظاهري HCG (IU/L)
hFSH(IU/L)	1000 500 100	<1 <1 <1
HCG (IU/L)	1000 500 100	<1 <1 <1
hTSH(mIU/L)	1000 500 100	<1 <1 <1

6- اثر هوك (Hook Effect)

آزمايش h LH جهت سرمهايي با غلظت بسيار بالا از اين آناليت (2500 IU/L) صورت گرفت كه پديده هوك مشاهده نشد .

Adress :
No:1161 , Bid Avenue , Payetakht , Industrial zone , Tehran , Iran
Tel : +98 21 66 56 91 84 - 66 59 37 41 Fax : +98 21 66 56 14 28
Email : info@biokarpira.com
www.biokarpira.com

043 ISO 9001-2008 13485