

LH ELISA Kit



کیت سنجش LH به روش الایزا

حیطه کاربرد:

کیت الایزای سنجش LH پیشتاز طب برای سنجش کمی هورمون لوتینه کننده (LH) در نمونه سرم انسان طراحی شده است. این کیت به عنوان یک ابزار کمک تشخیصی در ارزیابی عملکرد محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد و بررسی اختلالات عملکردی گنادها، در کنار سایر یافته های بالینی و روش های تشخیصی مورد استفاده قرار می گیرد. محتوای این کیت تنها برای تشخیص آزمایشگاهی می باشد.

مقدمه:

LH هورمون گلیکوپروتئینی است که از سلول های بازوفیلیک بخش قدامی غده هیپوفیز ترشح می شود. ترشح LH توسط هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH) که از هیپوتالاموس ترشح می شود، تحریک می گردد. از طرف دیگر هورمون های استروئیدی و مهار (Inhibin) اثرات قیدیک منفی و مثبت بر عملکرد LH دارند. ترشح LH دارای یک الگوی نوسانی می باشد و در خانم ها نسبت به آقایان با وضوح بیشتری قابل مشاهده است. در خانم ها در دوره عادت ماهانه غلظت LH دارای تغییراتی است؛ بدین ترتیب که در آغاز عادت ماهانه (فاز فولیکولار) و در انتهای آن (فاز لوتال) غلظت این هورمون پایین است. با افزایش LH در اواسط دوره عادت ماهانه، عمل تخمگذاری (Ovulation) صورت می پذیرد. در خانم های یائسه به علت فقدان وجود اثر مهار هورمون های استروئیدی مترشح از تخمدان، مقدار LH افزایش می یابد. در آقایان هورمون LH با اثر بر سلول های لایدیگ بیضه (Leydig Cell) باعث تحریک ساخته شدن تستوسترون می شود؛ هورمونی که برای عمل اسپرماتوژنز (تولید اسپرم) ضروری است. در اطفال میزان LH پایین بوده و تا قبل از سن بلوغ تغییر چندانی نمی کند. سنجش LH در خانم ها به منظور بررسی اختلالات عادت ماهانه، آمنوره اولیه و ثانویه، هیرسوتیسم و ویریلیسم به کار می رود. افزایش ناگهانی LH در آقایان در موارد ناباروری، هیپوگنادیسم، ژنیکوماستیا به منظور بررسی عملکرد غده هیپوتالاموس و هیپوفیز حائز اهمیت می باشد. کیت حاضر قابلیت اندازه گیری و تیراسیون 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 بادی های مونوکلونال می باشد. در این روش چاهک ها توسط آنتی بادی هایی علیه یک شاخص آنتی ژنیک مولکول LH پوشش (Coating) داده می شوند. نمونه بیماران با آنتی بادی پوشش داده شده در ته چاهک ها مجاور می شود. سپس آنتی بادی ثانویه ضد LH متصل به آنزیم HRP به چاهک ها اضافه می شود. مقدار کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهک ها با غلظت LH در نمونه ها متناسب است. پس از شستشو، محلول رنگزا که حاوی هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و کروموزن است، داخل چاهک ها ریخته می شود. رنگ آبی پدید آمده با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهک ها متناسب است. با افزودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که بهترین جذب نوری را در طول موج 450 nm دارد.

محتویات کیت:

- ۱) پلیت حاوی چاهک های پوشش داده شده با آنتی بادی ضد LH (Anti-LH Coated Plate).
- ۲) محلول آنزیم کونژوگه (Enzyme Conjugate): ویال حاوی محلول کونژوگه شده با آنزیم HRP (آماده مصرف).
- ۳) سری استاندارد (Standard Set): ۶ ویال استاندارد شامل با غلظت های صفر، ۰.۲۵، ۰.۵، ۱.۰، ۲.۵، ۵.۰ و ۱۰.۰ IU/L از LH کالیبره شده بر مبنای WHO 2nd IS 80/552.
- ۴) سرم کنترل (Control Serum): یک ویال حاوی سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال.
- ۵) محلول شستشو (Wash Solution): یک ویال حاوی محلول شستشوی غلیظ (20X)، به منظور تهیه محلول شستشوی آماده مصرف مقدار لازم از محلول شستشوی غلیظ را به نسبت ۱:۲۰ با آب مقطر رقیق کنید.
- ۶) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate): ویال حاوی تترامتیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده مصرف).
- ۷) محلول متوقف کننده (Stop Solution): یک ویال حاوی اسید کلریدریک ۱ نرمال.
- ۸) برچسب مخصوص پلیت.
- ۹) دفترچه راهنمای محصول.

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

- ۱) دستگاه الایزا ریدر (ELISA Reader) دارای فیلتر 450 nm (و در صورت امکان 630 nm به عنوان فیلتر رفرانس).
- ۲) سمپلهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر دقیق.
- ۳) آب مقطر.

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان:

- ۱) محتویات این کیت فقط برای مصرف در همین کیت می باشد.
- ۲) از مخلوط کردن محتویات کیت ها با شماره ساخت های مختلف جداً خوداری نمایید.
- 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. برای احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند.

LH ELISA Kit



۴) نمونه‌ها، استانداردها، کنترل‌ها و چاهک‌های استفاده شده، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند. تمامی محلول‌های واکنش گر و معرف‌ها باید مطابق با مقررات ملی دفع پسماندهای عفونی امحا شوند.

شرایط نگهداری:

- ۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد 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 می‌باشد.
- ۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱:۲۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و مصرف می‌باشد.

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه:

سرم را می‌توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود. نمونه می‌تواند برای مدت دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود. برای نگهداری بیش از مدت دو روز باید از دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد استفاده گردد. در ضمن باید از ذوب و انجماد مکرر نمونه پرهیز شود. از نمونه‌های مشکوک به آلودگی میکروبی برای انجام آزمایش استفاده نشود.

توضیحات عمومی:

- ۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه‌ها را به دمای 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 متوقف‌کننده، جذب نوری چاهک‌ها حداکثر تا نیم ساعت قابل اندازه‌گیری می‌باشد.
- ۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهک‌ها به صورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهک‌ها تخلیه شوند.
- ۶) در هنگام سمپلینگ تمام محلول‌ها و نمونه‌ها را وسط چاهک‌ها بریزید.
- ۷) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب، زمان انکوباسیون مناسب می‌باشد. بنابراین پیشنهاد می‌گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلول‌های مورد نیاز را آماده نموده و در محلول‌های مورد نیاز را باز کنید. این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیق‌تر می‌شود.
- ۸) به دلیل مشابه در بند ۷ بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه‌ها بیش از ۵ دقیقه به طول نیانجامد.
- ۹) شستشوی صحیح با مقدار مناسب بافر شستشو به منظور حصول نتایج قابل اعتماد بسیار ضروری است.

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) مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر استاندارد، سرم کنترل و نمونه را در هر چاهک بریزید. پیشنهاد می‌گردد استانداردها و نمونه‌ها به صورت دپلیکیت (Duplicate) استفاده شوند؛ به این معنی که هر استاندارد و نمونه در دو چاهک قرار گیرد و در نهایت از میانگین جذب نوری آن‌ها برای محاسبه نتایج استفاده شود.
- ۳) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه (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 برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهک‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۸-۲۲ درجه سانتی‌گراد) انکوبه نمایید.
- ۵) محتویات چاهک‌ها را خالی کرده و چاهک‌ها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشوید (برای شستشو می‌توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود؛ ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود، زیرا می‌تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد. در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک‌ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید. 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 متوقف‌کننده (Stop Solution) به هر چاهک، ادامه واکنش‌های آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزا ریدر با فیلتر 450 nm استفاده نمایید (توصیه می‌شود از فیلتر 630 nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد).

محاسبه نتایج:

از هر دستگاه الایزا ریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج 450 nm می‌توان استفاده نمود.

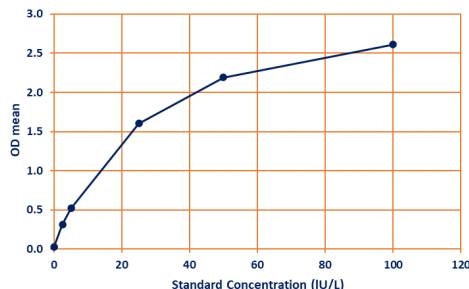
۱. جذب نوری استانداردها و نمونه‌ها را به کمک دستگاه الایزا ریدر در طول موج 450 nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس 630 nm) بخوانید.
۲. با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آن‌ها نموداری (Point to Point) رسم کنید؛ به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت 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.



LH ELISA Kit



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، به طوری که 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. (برای این کار می‌توانید از محاسبه گر خودکار پیشتاز طب استفاده کنید.)



جذب نوری	استانداردها (IU/L)
۰/۰۲۶	۰
۰/۳۱۵	۲/۵
۰/۵۲۱	۵
۱/۶۰۴	۲۵
۲/۱۸۹	۵۰
۲/۶۰۹	۱۰۰

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

مقادیر مورد انتظار:

مقادیر نرمال در سرم افراد سالم که توسط تست‌های مکرر به روش الایزا بدست آمده به قرار زیر می‌باشد ولی پیشنهاد می‌گردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد:

محدوده طبیعی (IU/L)	میانگین محدوده طبیعی (IU/L)	ملاحظات
۱۰ - ۱۱	۶	خانم‌های سالم قبل از یائسگی:
۱۰ - ۸۰	۴۵	در فاز فولیکولار
۱۰ - ۱۴	۷/۵	در اواسط دوره عادت ماهانه
۸/۱ - ۴۴	۲۶/۰۵	در فاز لوتئال
۱/۲ - ۸/۶	۴/۹	خانم‌های یائسه
		مردان زیر ۶۰ سال

شاخص‌های اجرایی:

۱) حداقل مقدار قابل اندازه‌گیری:

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت LH قابل تشخیص در این کیت 1 IU/L می‌باشد. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP17-A2 انجام شده است.

۲) دقت آزمایش:

آزمایش‌های درون‌سنجی (Intra Assay) (هم‌خوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و میان‌سنجی (Inter Assay) (هم‌خوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایش‌های مختلف) با استفاده از ۳ سرم با غلظت‌های مختلف hLH انجام گردید که در جداول ۱ و ۲ آمده است. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP05-A3 انجام شده است.

LH ELISA Kit



جدول ۱ - نتایج Intra Assay

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 ۲ - نتایج Inter Assay

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 به صورت Duplicate انجام شده است.



LH ELISA Kit



۳) ریکاوری آزمایش:

مقادیر معلومی از hLH به ۴ نمونه سرم با غلظت‌های مشخص hLH افزوده شد و ریکاوری آن‌ها محاسبه گردید. نتایج مربوطه در جدول ۳ آمده است. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP34 انجام شده است.

جدول ۳ - نتایج ریکاوری آزمایش.

نمونه	مقدار hLH موجود در نمونه (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

۴) خطی بودن آزمایش:

با استفاده از استاندارد صفر، رقت‌های متوالی از ۶ نمونه سرم با غلظت مشخص از hLH تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت محاسبه شد که در جدول ۴ نتایج آن آورده شده است. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP06-A انجام شده است.

جدول ۴ - نتایج بررسی خطی بودن آزمایش.

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

۵) اختصاصیت آزمایش:

اختصاصیت این آزمایش به کمک سرم‌هایی با غلظت‌های مختلف hFSH، hTSH و hCG به منظور بررسی واکنش‌های متقاطع با hLH سنجیده شد که نتایج آن در جدول ۵ آمده است. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP14-A3 انجام شده است.

جدول ۵ - نتایج تست اختصاصیت (واکنش متقاطع).

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

۶) اثر هوک (Hook Effect):

آزمایش hLH بر روی سرم‌هایی با غلظت بسیار بالا از این آنالیت (تا 2500 IU/L) صورت گرفت که پدیده هوک مشاهده نشد. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP34 انجام شده است.

۵

آدرس: تهران، شهر گلستان، بلوار گل‌ها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن: ۴۲۱۹۷۰۰۰، پیامک: ۳۰۰۰۷۱۴۰۲
info@pishtazteb.com, www.pishtazteb.com
ویرایش نهم - دی ۱۴۰۴



LH ELISA Kit



منابع:

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



LH ELISA Kit



جدول علائم:

	Use by	تاریخ انقضاء
	Batch code	شماره سری ساخت
	Serial number	شماره سریال
	Date of manufacture	تاریخ تولید
	Catalogue number	شماره کاتالوگ
	Caution: consult accompanying documents	توجه به مدارک همراه
	Manufacturer	تولیدکننده
	Contains sufficient for <n> tests	محتویات برای n تست کافیت
	In vitro diagnostic medical devices	فراورده تشخیصی
	Temperature limitation	محدوده دمای نگهداری
	Consult instructions for use	کتابچه راهنما
	Biological risks	خطرات زیستی
	Control	کنترل
	Negative control	کنترل منفی
	Positive control	کنترل مثبت

۷

آدرس: تهران، شهرک گلستان، بلوار گل‌ها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
 تلفن: ۴۲۱۹۷۰۰۰، پیامک: ۳۰۰۰۷۱۴۰۲
info@pishtazteb.com, www.pishtazteb.com
 ویرایش نهم - دی ۱۴۰۴



LH ELISA Kit



روش انجام آزمایش LH به صورت شماتیک

چاهک‌های کوت شده با آنتی‌بادی به منظور تست LH			
محل‌ها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
استانداردها	۵۰ میکرولیتر	-	-
سرم کنترل	-	۵۰ میکرولیتر	-
نمونه	-	-	۵۰ میکرولیتر
آنزیم کونژوگه	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
پلیت را به ملایمت برای مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهک‌ها بخوبی 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.			
محل‌ها رنگ‌زا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید.			
محل‌ها متوقف‌کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهک‌ها را با طول موج 450 nm (و در صورت امکان 630 nm به عنوان فیلتر رفرانس) خوانش کنید.			

جدول محتویات کیت

محتویات کیت	فرمت ۴۸ تستی	فرمت ۹۶ تستی	فرمت ۱۹۲ تستی
پلیت Plate	1×48-wells	1×96-wells	2×96-wells
محل‌ها آنزیم کونژوگه Enzyme Conjugate	1×6 ml	1×12 ml	2×12 ml
سری استانداردها Standard Set	St.0: 1×1 ml Other St.: 5×0.5 ml	St.0: 1×2 ml Other St.: 5×1 ml	St.0: 1×4 ml Other St.: 5×2 ml
سرم کنترل Control Serum	1×0.5 ml	1×1 ml	1×2 ml
محل‌ها رنگ‌زای یک مرحله‌ای Chromogen - Substrate	1×6 ml	1×12 ml	2×12 ml
محل‌ها شستشو Wash Solution	1×25 ml	1×50 ml	2×50 ml
محل‌ها متوقف‌کننده Stop Solution	1×6 ml	1×12 ml	2×12 ml
برچسب مخصوص پلیت Cardboard Sealer	1	1	2
دستورالعمل استفاده Instruction for Use	1	1	1