کیت ایمونو آنزیماتیک (EIA) پادتن علم (۹۶ تستی)

LH

موارد استفاده:
تعیین کمّی LH در سرم یا پلاسما

I. مقدمه

هورمون (Luteinizing Hormone) LH یا Lutropin، گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ۳۰ kDa ، از دو زنجیره α و ß ساخته شده است که با پیوندهای غیر کووالانسی به هم متصل شده‌اند. برخلاف زنجیره اختصاصی ß که مسئول خصوصیات هورمونی و ایمونولوژیکی LH است، زنجیره α شباهت ساختمانی زیادی با زنجیره α هورمون‌های FSH، TSH و hCG دارد [۱-۳].

LH که توسط سلول‌های لوب قدامی هیپوفیز ترشح می‌شود. این ترشح به وسیله یک دکاپپتید هیپوتالامیک به نام هورمون آزاد کنندهٔ گونادوتروپین (GnRH) تحریک می‌شود [۴-۵].

در زنان، ترشح LH وابسته به سیکل ماهیانه است. در ابتدای سیکل، سیستم فیدبک منفی هورمون‌های استروئیدی (پروژسترون و استرادیول) باعث مهار ترشح LH و تحریک ترشح GnRH می‌شود. در نیمه‌های سیکل بالا رفتن تیتر GnRH ترشح LH را تحریک می‌کند. ۱۲ تا ۱۸ ساعت بعد از ماکزیمم ترشح LH، این هورمون با تحریک گیرنده‌های اختصاصی LH بر روی غشای سلول‌های تکای (theca) تخمدان‌ها باعث تخمک‌گذاری، رشد جسم زرد، و تحریک ترشح پروژسترون تخمدانی می‌شود. سپس سنتز LH به سرعت کاهش می‌یابد و مانند ابتدای سیکل توسط فیدبک منفی هورمون‌های استروئیدی مهار می‌شود.

در زنان یائسه به دلیل پایین بودن سطح هورمون‌های استروئیدی، فیدبک منفی این هورمون‌ها غیرفعال است. بنابراین سنتز LH مستمر و سطح سرمی این هورمون بالا است.

در مردان، این هورمون با تحریک گیرنده‌های اختصاصی LH بر روی غشای سلول های لیدیگ (Leydig) بیضه سبب سنتز تستوسترون و تحریک اسپرماتوژنز می‌شود [۴-۷،۱۲-۱۱].

اندازه‌گیری غلظت LH در سرم یا پلاسما، در تشخیص نارسایی‌های محور هیپوتالاموس – هیپوفیز – گنادها اهمیت دارد و در تشخیص افتراقی بیماری‌هایی که با افزایش یا کاهش آن مرتبط هستند، مفید است [۱۰-۸].

II. اصول اندازه‌گیری

کیت اندازه‌گیری کمّی LH بر مبنای سنجش واکنش ایمونوآنزیماتیک بر روی فاز جامد طراحی شده است. در این سیستم از دو آنتی بادی مونوکلنال موش که شاخص‌های آنتی ژنیک متمایزی را بر روی مولکول LH شناسائی می‌کنند، استفاده شده است. ابتدا در حفره‌های پلی استایرن پوشیده شده با آنتی‌بادهای منوکلنال LH، استانداردها، سرم کنترل ها و نمونه های بیماران ریخته می شود. سپس آنتی بادی دوم ضد LH که به آنزیم پراکسیداز (HRP) متصل شده است به حفره‌ها افزوده می‌شود. در حین انکوباسیون، LH موجود در نمونه‌ها از طرفی به آنتی‌بادی های ضد LH متصل به پلی استایرن و از طرف دیگر به آنتی‌بادی دوم ضد LH که به آنزیم پراکسیداز (HRP) متصل شده است وصل میگردد. بعد از انکوباسیون و شستشو با افزودن سوبسترای TMB (۳ و ´۳ – ۵ و ´۵ تترامتیل بنزیدین) سبب ایجاد رنگ آبی توسط آنزیم می شود. شدت رنگ ایجاد شده با غلظت LH موجود در نمونه‌ها نسبت مستقیم دارد. پس از افزودن محلول متوقف کننده رنگ زائی واکنش آنزیماتیک خاتمه می یابد و رنگ آبی ایجاد شده به رنگ زرد تبدیل میشود. شدت رنگ با اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری می‌شود. برای تعیین غلظت LH نمونه‌ها ابتدا منحنی جذب نور استانداردها برحسب غلظت LH آنها رسم و سپس میزان غلظت LH نمونه از روی منحنی استاندارد تعیین می‌شود.

III. محتویات کیت:

محلولهای این کیت(Cat.No.P-LHI) برای انجام ۹۶ تست در نظر گرفته شده و تاریخ انقضای هر یک بر روی شیشه آن درج شده است. دمای مناسب برای نگهداری کیت ۸-۲ درجه سانتی‌گراد است.

۱. **پلیت:** پلیت ۹۶ حفره‌ای پوشش داده شده با آنتی‌بادی‌های منوکلنال ضد LH موش

۲. **استاندارد صفر:** ۱ ویال ۴ میلی‌لیتری. از استاندارد صفر برای رقیق کردن نمونه‌ها استفاده شود.

۳. **استانداردها:** ۵ ویال ۱ میلی لیتری محلول سرم دار حاوی LH انسان. غلظت های دقیق LH استانداردها، که برمبنای استاندارد سازمان بهداشت جهانی(2nd IRP 80/552) کالیبر شده‌اند، بر روی برچسب آنها درج شده است.

۴. **کنترل‌های سرمی:** ۲ ویال ۱ میلی لیتری سرم انسان. غلظت‌های دقیق LH کنترل‌های سرمی بر روی برچسب کنترل‌ها درج شده است.

۵. **ردیاب آنزیمی:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری آنتی‌بادی مونوکلنال ضد LH متصل به پراکسیداز (HRP) محلول در بافر PBS، حاوی پروتئین و تیمروزال.

۶. **محلول شستشوی غلیظ (۲۰X):** یک ویال ۱۲ میلی لیتری ۲۰ PBS-Tween و تیمروزال.

۷. **محلول رنگ زا:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری بافر حاوی H_2O_2 و TMB.

۸. **محلول متوقف کننده واکنش:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری H_2SO_4 دو نرمال

IV. وسایل مورد نیاز (این وسایل همراه کیت عرضه نمی‌شوند):

۱. دستگاه اسپکتروفتومتر میکروپلیت با دامنه جذب نوری ۳-۰ در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر

۲. میکروپیپت قابل تنظیم بر روی ۲۵ و ۱۰۰ میکرولیتر و تیپ های یکبار مصرف

۳. آب مقطر یا آب دیونیزه برای رقیق کردن محلول شستشو

V. نحوه جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها:

نمونه مناسب برای اندازه‌گیری LH، سرم یا پلاسمای هپارینه بیمار است. این نمونه ها را تا یک هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد می‌توان نگهداری کرد. برای نگهداری نمونه‌ها به مدت طولانی‌تر، سرم یا پلاسمای بیمار را در حجم‌های کم تقسیم و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. بهتر است از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه‌ها اجتناب نمود. برای اندازه‌گیری LH نمونه‌های منجمد شده، ابتدا نمونه را در دمای اتاق ذوب و سپس با حرکت دست یکنواخت کنید. برای یکنواخت کردن نمونه‌ها از Vortex استفاده نکنید. برای اندازه‌گیری دقیق نمونه‌هائی که LH آنها بیش از آخرین استاندارد است، ابتدا نمونه‌ها را با استاندارد صفر رقیق و دوباره اندازه‌گیری کنید. بدیهی است در محاسبه نتایج این نمونه‌ها، ضریب رقت منظور می‌شود.

VI. روش کار:

قبل از شروع کار باید دمای تمامی محلول‌ها به دمای اتاق برسد.

محلول شستشوی غلیظ به نسبت یک به بیست با آب مقطر یا دیونیزه رقیق شود (یک حجم محلول شستشوی غلیظ به ازاء ۱۹ حجم آب). محلول شستشوی رقیق را یک هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد می‌توان نگهداری کرد. درصورت مشاهده کریستال در محلول غلیظ شستشو، ویال را چند دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید تا محلول یکنواخت شود.

۱. ابتدا ۲۵ میکرولیتر از استانداردها، سرم کنترل‌ها و سرم بیماران را در حفره‌ها بریزید، و به آن ۱۰۰ میکرولیتر کونژوگه ضد LH (HRP) اضافه کنید. سپس با تکان دادن پلیت، محتویات حفره‌ها را به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط نمائید.

۲. پلیت را یک ساعت در دمای اتاق قرار دهید.

۳. حفره‌ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشوئید.

۴. به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای TMB اضافه نمائید.

۵. پلیت را ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و در محلی تاریک قرار دهید.

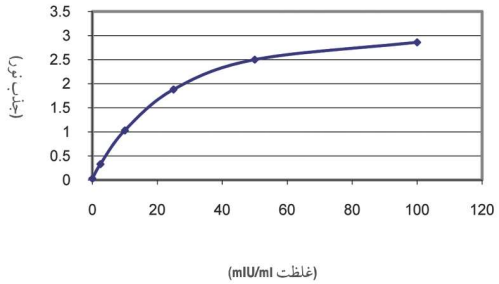
۶. ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده واکنش در هر حفره بریزید و ۱۰ ثانیه مخلوط کنید. میزان جذب نور حفره‌ها را تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) بخوانید.

VII. محاسبه نتایج:

پس از تعیین میزان جذب نوری استانداردها و نمونه‌ها و ترسیم منحنی استاندارد، غلظت LH بیماران را می‌توان محاسبه کرد. در منحنی مذکور که با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (قابل برنامه‌ریزی) و یا به صورت دستی ترسیم می‌شود، محور Y شاخص میزان جذب نور استانداردهای LH در طول موج ۴۵۰ nm و محور X شاخص غلظت استانداردهای LH برحسب mIU/ml است. نتایجی که در جدول زیر آمده، فقط مثال است و نباید برای تعیین غلظت نمونه ها از آن استفاده شود.

نمونه	جذب نور	غلظت LH (mIU/ml)
استاندارد A	۰/۰۳	۰/۰
استاندارد B	۰/۳۳	۲/۵
استاندارد C	۱/۰۳	۱۰/۰
استاندارد D	۱/۸۸	۲۵/۰
استاندارد E	۲/۵۰	۵۰/۰
استاندارد F	۲/۸۶	۱۰۰/۰
سرم	۰/۸۴	۸/۵

برای ترسیم منحنی از غلظت‌های مندرج بر روی ویال استانداردها استفاده کنید.



VIII. مقادیر طبیعی:

در کتاب‌های مرجع مقادیر طبیعی LH برای افراد سالم در سرم یا پلاسما به شرح زیر گزارش شده است.

Adult male	۱/۷-۸/۶ mIU/ml
Adult female	
-Folicular	۲/۴-۱۲/۶ mIU/ml
-Ovulatory peak	۱۴-۹۵/۶ mIU/ml
-Luteal	۱/۵-۱۱/۴ mIU/ml
-Postmenopausal	۷/۷-۵۸/۵ mIU/ml

توصیه می‌شود هر آزمایشگاه با در نظر گرفتن غلظت سرمی LH افراد سالم دامنهٔ طبیعی آن را تعیین و از آن برای تفسیر نتایج خود استفاده کند.

IX. ویژگی‌های اختصاصی تست:

۱. حساسیت: به حداقل غلظت LH که اختلاف جذب نوری آن نسبت به جذب نوری استاندارد صفر، معنی‌دار باشد، حساسیت کیت گفته می‌شود. این مقدار برای کیت LH ، ۰/۵ mIU/ml است.

۲. اختصاصی بودن: اختصاصی بودن تست LH با اندازه گیری غلظت LH بعد از افزودن مقادیر بالایی از هورمون های FSH (۵۰۰ mIU/ml)، TSH (۱۰۰ mIU/ml)،و ßHCG (۱۰۰،۰۰۰ mIU/ml) بررسی شده است. نتایج این آزمایشات تداخلی، در جدول زیر نشان داده شده است.

هورمون		LH (mIU/ml)	
نام	غلظت	غلظت اندازه گیری شده	غلظت پیش بینی شده
ßHCG	۱۰۰،۰۰۰ mIU/ml	۲۴/۱	۲۴/۷
FSH	۵۰۰ mIU/ml	۲۱/۴	۱۹/۵
TSH	۱۰۰ mIU/ml	۲۱/۲	۱۹/۵

۳. اثر Hook: در کیت EIA پادتن علم برای نمونه‌های رقیق نشده تا غلظت تقریبی ۱۰۰،۰۰۰ mIU/ml اثرHook مشاهده نشده است.

۴. دقت: شاخص دقت کیت با مقایسه تکرارپذیری جواب‌ها به روش میان‌سنجی (Inter-assay) و درون‌سنجی (Intra-assay) تعیین گردیده است. برای این منظور ۴ نمونه سرم ده بار در یک دوره آزمایش (درون‌سنجی) و یکبار در ده دوره آزمایش متفاوت (میان‌سنجی) تعیین غلظت شده است. نتایج انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات (CV) در جدول زیر آمده است.

جدول شاخص دقت

درون‌سنجی			میان‌سنجی		
٪CV	SD	mIU/ml میانگین	٪CV	SD	mIU/ml میانگین
۵/۴	۰/۳	۵/۹	۳/۴	۰/۲	۵/۶
۶/۶	۱/۵	۲۲/۹	۲/۹	۰/۷	۲۲/۲
۳/۳	۱/۵	۴۵/۳	۱/۴	۰/۶	۴۲/۵
۳/۶	۳/۲	۸۷/۸	۵/۴	۳/۹	۷۱/۴

۵. ریکاوری و رقت: ریکاوری به حالتی اطلاق می‌شود که با افزودن حجم معینی از یک محلول با غلظت بالا، به نمونه رقیق‌تر، افزایش غلظت حاصل شود. برای تعیین ریکاوری، محلولی با غلظت بالای LH به نمونه سرمی که غلظت پائینی از LH دارد، افزوده شده است. درصد ریکاوری طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$\frac{\text{غلظت اندازه‌گیری شده (mIU/mI)}}{\text{غلظت پیش‌بینی شده (mIU/mI)}} \times ۱۰۰$$

دامنه درصد ریکاوری بدست آمده از ۹۲/۵ تا ۹۷/۰ است.

جدول ریکاوری

ریکاوری ٪	غلظت اندازه‌گیری شده (mIU /ml)	غلظت پیش‌بینی شده (mIU /ml)	غلظت افزوده شده (mIU /ml)
–	۱۴/۳	–	–
۹۷/۰	۱۹/۸	۲۰/۴	۶/۱
۹۵/۸	۲۴/۹	۲۶/۰	۱۱/۷
۹۵/۰	۳۳/۶	۳۵/۴	۲۱/۱
۹۲/۵	۴۵/۸	۴۹/۵	۳۵/۲

برای بررسی خطی بودن رقتهای LH بر روی منحنی چندین نمونه سرمی غلیظ، پس از رقیق شدن متوالی با استاندارد صفر، اندازه‌گیری شده و نتایج یک نمونه برای مثال در جدول زیر آورده شده است. دامنه درصد ریکاوری بدست آمده از ۹۶/۰ تا ۱۰۱/۳ است.

جدول رقت

ریکاوری	غلظت اندازه‌گیری شده (mIU/ml)	غلظت پیش‌بینی شده (mIU/ml)	تست
–	۱۲۰/۰	–	–
۹۷/۰	۵۸/۲	۶۰/۰	۱:۲
۹۶/۰	۲۸/۸	۳۰/۰	۱:۴
۱۰۱/۳	۱۵/۲	۱۵/۰	۱:۸
۹۶/۰	۷/۲	۷/۵	۱:۱۶

توصیه می‌شود هر آزمایشگاه با در نظر گرفتن غلظت سرمی LH افراد سالم منطقه، دامنهٔ طبیعی آن را تعیین و از آن برای تفسیر نتایج خود استفاده کند.

۶. مقایسه با کیت Roche Elecsys: برای بررسی همبستگی آماری بین کیت EIA پادتن علم و کیت Roche Elecsys ، غلظت LH ۵۰۰ نمـــونه تصادفـی با هـــر دو کیت اندازه گیری شد . مقایسه نتایج بدست آمده ضریب همبستگی ۰/۹۶ را نشان می دهد .

X. References

1. Shome, B., Parlow, A.F. Human follicle stimulating hormone (hFSH): First proposal for the amino-acid sequence of the subunit of (hFSH) and first demonstration of its identity with the a-subunit of human luteinizing hormone (hLH). Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 39:199-202, 1974.

2. Sairam, M.R., Li, C.H. Human pituitary thyrotrophin. Isolation and chemical characterization of its subunits. Biochemical and Biophysical Research communications. 51:336-342, 1973.

3. Carlsen, R. B., Bahl, O. P. Swaminathan, N. Human chorionic gonadotropin. Linear amino-acid sequence of the subunit. Journal f Biological Chemistry. 248:6810-6827, 1973.

4. The Nomenclature of Peptide Hormones, IUPSC, IUB, Commission of Biochemical Nomenclature. Recommendations. Biochimica and Biophysica Acta 404:152-1555, 1975.

5. Frachimont, P., Human gonadotropin secretion in male subjects: 439-458 in James, V. H. T., Serio M., Martini, L., (eds.). The Endrocrine Function of Human Testis. New York, Academic Press. 1:590, 1973.

6. Marshall, J. C. Investigative Procedures. Clinics in Endocrinology and Metabolism. 4:545-567, 1975.

7. Besser, G. M., NcNeilly, A. S., Anderson, D. C., Marshall. J. C., Harsoulis, P., Hall, R., Ormston, B. J., Alexande, L., Collins, W. P. Homonal Response to synthetic luteinizing hormone and follicle stimulating hormone-releasing hormone in man. British Medical Journal. 3:267-271, 1972.

8. Taymor, M. L., Thompson, I. E., Berger, M. J., Patton, W. Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) as a diagnostic and research tool in gynecologic endrocrinology. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 120:721-732, 1974.

9. Franchimont, P., Becker, H., Valcke, J. C., Scellens, C. M., Demoulin, A., Thys, O., Bourguignon, J. P., Legros, J. J. Action of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) on gonadotrophins in normal and Pathological conditions. In Vokaer, R., DeBock, G., (eds.), Reproductive Endocrinology, Oxford, Pergamon. 185:202-252, 1975.

10. Shaw, R. W., Butt, W. R. London, D. R., Marshall, J. C. The estrogen provocation test: a method of assessing the hypothalamic-pituitary axis in patients with amenorrhoea. Clinical Endrocrinology (Oxford). 4:267-276, 1975.

11. Krieger, D. T., Ossowski, R., Fogel, M., Allen, W. Lack of circadian periodicity of human serum FSH and LH levels, Journal of Clinical Endocrinology metabolism. 34:619-623, 1972.

12. John R. Marshall. Introduction of ovulation Clin. Obst., Gyn. 21:147, 1978.

احتیاط!

با توجه به اینکه محلول‌های به‌کار رفته در این کیت‌ها حاوی مواد سمی مانند تیمروزال و مواد پروتئینی با منشا انسانی و حیوانی هستند، و اینکه با هیچ تستی نمی توان از عدم وجود ویروس‌هایی چون HCV، HBV، HIV در این محلول‌ها اطمینان کامل حاصل کرد، خواهشمند است هنگام کار احتیاط‌های لازم از جمله استفاده از دستکش، امتناع از خوردن و آشامیدن و سیگار کشیدن، خودداری از پیپت کردن با دهان و پرهیز از هرگونه تماس محلول با چشم و دست‌ها، رعایت شود.

Rev: Jul.2020

تهران ۱۴۱۶۸، خیابان طالقانی غربی، خیابان شهید سرپرست (کیوان جنوبی)، پلاک ۲۶
تلفن و فکس: ۶۳۴۸۱(۰۲۱)