

Human Luteinizing Hormone (LH) IRMA Kit

مقدمه

هورمون Luteinizing (LH) ملکولی گلیکوپروتئینی بزرگی است که دارای دو زیرواحد آلفا و بتا می باشد. زیرواحد آلفا در سه هورمون LH، TSH و FSH متشخصه از هیپوفیز قدامی یکسان هستند، در حالیکه زیرواحد بتا در آنها متفاوت بوده و این زیرواحد توانایی اتصال به رسپتور مربوطه را داراست. این هورمون از هیپوفیز قدامی از سلول هایی تحت عنوان گنادوتروف ها ترشح می شوند. در هر دو جنس زن و مرد، LH ترشح استروئیدهای جنسی از غدد جنسی را تحریک می کند. در بیضه ها، اتصال LH به رسپتورهای روی سلولهای لیدیگ (Leydig cells) باعث تحریک سنتز و ترشح تستوسترون می شود. در تخمدان ها، LH باعث تحریک ترشح استروژن می شود. در زنان، تخمک گذاری فولیکول های بالغ در تخمدان با ترشح ناگهانی و با لای LH القاء می شود که تحت عنوان موج LH قبل از تخمک گذاری (preovulatory LH surge) نامیده می شود. سلول های باقی مانده داخل فولیکول های تخمک گذاری شده برای تشکیل اجسام زرد رشد می کنند. این اجسام زرد هورمون های استروئیدی پروژسترون و استرادیول ترشح می کنند که پروژسترون برای نگهداری بارداری ضروری است. در اغلب پستانداران، LH برای ادامه بقاء و عملکرد اجسام زرد مورد نیاز است. در واقع نام LH از این اثر تولید جسم زرد (luteinization) از فولیکول های تخمدان منشاء گرفته شده است. تعیین غلظت این هورمون در مسئله باروری حائز اهمیت می باشد.

اساس روش اندازه گیری

کیت LH IRMA موجود، براساس سنجش ایمونولوژیکی رادیواکتیو ساندویچی تهیه شده است. LH موجود در نمونه ها بعنوان آنتی ژن به دو آنتی بادی زوج اختصاصی خود متصل می گردد. هر دو آنتی بادی از نوع منوکلونال موشی هستند که یکی بر روی فاز جامد (لوله ها) پوشش داده شده است و دیگری به ید-125 متصل شده است. نمونه مورد آزمایش که دارای LH است، در معرض دو آنتی بادی قرار می گیرد. پس از زمان انکوباسیون، چاهک ها تخلیه شده و شستشو داده می شوند تا آنتی بادی متصل به ید-125 اضافی خارج گردد. سپس اکتیویته موجود در هر لوله توسط شمارنده گاما اندازه گیری می شود که این اکتیویته بطور مستقیم با غلظت LH در نمونه ها متناسب است. استانداردهای LH با غلظت مشخص، همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که براساس منحنی استاندارد مقدار شمارش مقابل غلظت LH، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید.

معرف ها:

- لوله های پوشش داده شده: شامل 100 لوله که با آنتی بادی منوکلونال موشی ضد LH پوشش داده شده اند.
- ردیاب (آنتی بادی علیه LH نشاندار شده با ید-125): یک ویال 12 میلی لیتری آماده مصرف.

- استانداردها: 8 ویال یک میلی لیتری از استاندارد با غلظت های ۰.۵، ۲.۵، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، براساس mIU/ml که در سرم نرمال انسانی تهیه شده و از تیومرسال بعنوان نگهدارنده استفاده شده است.
- سرم کنترل: یک ویال آماده مصرف
- محلول شستشو دهنده غلیظ (20X): یک ویال ۲۵ میلی لیتری محلول شستشو که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف لازم است این محلول به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شود.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست

- ۱- سمپلر ۱۰۰ میکرولیتری دقیق
- ۲- آب دیونیزه
- ۳- دستگاه شمارنده گاما
- ۴- کاغذ جاذب رطوبت
- ۵- لوله های آزمایش معمولی برای شمارش تام

نکات قابل توجه برای مصرف کنندگان

- ۱- در این کیت از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر HbsAg و HIV منفی بوده اند.
- ۲- از استفاده از مواد پس از تاریخ انقضاء خودداری کنید و از مخلوط کردن یا استفاده از کیت ها با شماره بچ مختلف پرهیز نمایید.
- ۳- درب ظروف را پس از استفاده ببندید و از تعویض درب ها جدا خودداری کنید.
- ۴- از لباس و دستکش یکبار مصرف هنگام کار با مواد رادیواکتیو استفاده کنید.
- ۵- لوازم آزمایشگاهی آلوده به مواد رادیواکتیو جداگانه و با روش های ایمن (براساس دستورالعمل های حفاظت در برابر اشعه) شستشو و یا پسماند نماید.

تهیه و جمع آوری نمونه

- ۱- آزمایش را باید بر روی نمونه های سرمی و پلاسمایی انجام داد. نمونه های شدیداً همولیزه و دارای چربی باید حذف شوند.
- ۲- نمونه ها را می توان برای هفت روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد و برای زمان های طولانی تر (تا سی روز) در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمود.
- ۳- از انجماد و ذوب مکرر نمونه ها باید خودداری کرد.
- ۴- معرف ها باید مستقیماً به لوله ریخته شوند.
- ۵- از تماس نوک سمپلر با ته لوله خودداری کنید.

آماده سازی معرف ها

- ۱- کلیه معرف ها را به دمای اتاق برسانید. قبل از استفاده آنها را به آرامی تکان دهید (سر و ته ننماید).
- ۲- برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمایید.

روش انجام آزمایش

۱- تعداد لوله های پوشش شده برای استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید. برای شمارش تمام از لوله های معمولی استفاده کنید.

۲- ۱۰۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر لوله بریزید.

۳- ۱۰۰ میکرولیتر از ردیاب را به تمام لوله ها اضافه کنید.

۴- لوله ها بمدت ۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات آنها خوب مخلوط شوند. سپس لوله ها را بمدت یک ساعت در همزن گردان مخصوص شرکت پادتن گستر ایثار و یا شیکر افقی (با سرعت 280 rpm) در درجه حرارت اتاق (۱۸ تا ۲۵ درجه سانتیگراد) انکوبه کنید.

۵- محتویات لوله ها را از طریق مکش یا وارونه کردن تخلیه نمائید (بجز لوله های شمارش تام). سپس لوله ها را دو بار و هر بار با دو میلی لیتر محلول شستشوی آماده مصرف شستشو دهید. برای اطمینان از تخلیه کامل، با وارونه نگهداشتن لوله ها بر روی کاغذ جاذب و با ضربت ملایم بر روی لوله تمامی مایع موجود در لوله ها را تخلیه کنید.

۶- با استفاده از شمارنده گاما، اکتیویته موجود در لوله ها را بمدت یک دقیقه شمارش کنید.

محاسبه نتایج

۱- با استفاده از میانگین شمارش استانداردها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) بر روی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد رسم کنید.

۲- میانگین شمارش برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

راهنمای محاسبه

مقادیر شمارش ارائه شده در جدول ذیل تنها بعنوان راهنمایی آورده شده است و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید بدست آورد.

ردیف	مقدار استاندارد (mIU/ml)	شمارش (n=3)	B/T(%)
0	شمارش تام	249134	----
1	0	401	0.16
2	0.5	1188	0.47
3	2.5	3434	1.37
4	5	5868	2.35
5	10	11269	4.52
6	25	25660	10.29
7	50	46663	18.73
8	100	88353	35.46

مقادیر طبیعی

بدلیل اختلافات سنی، نژادی و رژیم تغذیه، نمی توان برای تمام جمعیت ها محدوده مرجع تعیین کرد. بنابراین هر آزمایشگاه باید محدوده مرجع خود را گزارش نماید. در نمونه هایی که در Boarder line قرار دارند، آزمایش مجدد حتما تکرار شود.

مقادیر طبیعی در سرم افراد نرمال که توسط آزمایشات مکرر به روش IRMA بدست آمده است به قرار زیر می باشد:

زنان	
فاز فولیکولی	0.5 – 10.5 mIU/ml
میانه دوره ماهیانه	18.4 – 61.2 mIU/ml
فاز لوتئال	0.5 – 10.5 mIU/ml
دوران یائسگی	8.2 – 50.5 mIU/ml
مردان	
مقدار طبیعی	0.7 – 7.4 mIU/ml

خصوصیات کیت

۱- حساسیت

با تکرار و خوانش جذب استاندارد صفر، حساسیت کیت برای تعیین مقدار LH، بر اساس محاسبه $0.0 + 3SD$ برابر 1.0 mIU/ml بدست آمد.

۲- دقت

برای محاسبه میزان دقت در یک روز و روزهای مختلف، آزمایش بر روی ۳ نمونه سرم ۲۰ بار تکرار شد که ضریب تغییرات به شرح ذیل است.

ضریب تغییرات در روز

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (mIU/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	20	5.1	0.38	7.4
2	20	17.3	0.88	5.1
3	20	45.7	2.1	4.6

ضریب تغییرات در روزهای مختلف

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (mIU/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	10	6.7	0.42	6.2
2	10	15.4	0.63	4.1
3	10	67.5	2.84	4.2

۳- ویژگی

آنتی بادی های منوکلونال مورد استفاده در این کیت الایزا اختصاصی LH انسانی می باشند. هیچگونه تداخلی با FSH، TSH و HCG انسانی در غلظت های طبیعی دیده نشده است.

۴- خطی بودن

سه نمونه مختلف سرمی با استاندارد صفر به نسبت های ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۸ رقیق شدند. سپس غلظت LH در آنها با استفاده از کیت محاسبه شد که نتایج ذیل بدست آمد.

نمونه سرمی	غلظت اولیه (mIU/ml)	درصد بازیابی		
		1:2	1:4	1:8
1	18	102	105	108
2	36	98	103	105
3	70	104	107	104