

LH (IRMA)

کیت رادیوایمونومتریکی اسه LH

مقدمه:

هورمون LH یا لوتئینی یک هورمون گلیکوپروتئینی هترودايمری با دو زنجیره α با ۲۲ اسیدآمیننه و β با ۱۲۱ اسید آمینه می باشد که زنجیره α در تمام هورمون های استروئیدی دارای خصوصیات یکسان و مشترکی بوده ولی زنجیر β دارای خصوصیات ایمونولوژیکی می باشد که محل تأثیر این هورمون در تخمدان می باشد. وظیفه این هورمون شکل گیری تخمدان برای تخمک گذاری و ترشح پروژسترون و سبب تحریک بافت همبندی و ترشح آندروژن در بیضه آقایان می باشد. آزاد شدن این هورمون به سبب هورمون تحریک کننده GnRH از هیپوتالاموس می باشد که با تأثیر بر روی هیپوفیز قدامی باعث آزاد سازی محرک مربوط برای FSH و LH می شود. در مردان دارای الگوی ضربانی می باشد بطوریکه در اول صبح میزان آن بالا و در عصر میزان آن پائین است. وظیفه دیگر این هورمون تأثیر بر روی سلولهای لایدیگ و سنتز تستوسترون می باشد. استروئیدهای جنسی و ممانعت کننده ها با همکاری یکدیگر نقش فیدبک منفی در ترشح FSH و LH بازی می کنند.

اساس روش اندازه گیری:

کیت رادیوایمونومتریکی اسه سنجنش LH بر اساس واکنش غیر رقابتی تک مرحله ای می باشد. در این آزمایش از دو آنتی بادی LH مونوکلونال بسیار اختصاصی با توانایی تشخیص دو ملکول اپیتوپ متفاوت استفاده می شود. یک آنتی بادی بصورت فاز جامد کوت شده در لوله و دیگری بعنوان I 125 TRACER استفاده می شود. هر دوی این آنتی بادی ها همزمان با آنتی ژن های LH موجود در استاندارد، سرم کنترل و نمونه واکنش می دهند. مواد غیر اختصاصی در مرحله شستشو از واکنش خارج می شوند. میزان فرم اکتیویته موجود در لوله با غلظت LH نمونه رابطه مستقیم دارد. استانداردهای LH با غلظت مشخص همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که براساس منحنی استاندارد مقدار شمارش در مقابل غلظت LH، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید.

محتویات کیت:

Kit Contents	Quantity (100T)
1. Coated Tubes Main: Anti - LH monoclonal antibody	100 Tubes (50EA/Rack×2)
2. I 125 Tracer Main: Anti - LH monoclonal antibody Labelled with I 125 Diluent solution : BSA - PBS Preservative : 0.1% Sodium Azide	5ml×1vial Radioactivity 799 KBq (Ready to use)
3. Standards : Main: LH of each concentration (Range: 0, 2, 5, 20, 50, 100, 200 mIU/ml) Diluent solution : BSA - PBS Preservative : Sodium Azide	1 ml × 7 vials (Ready to use)
4. Control Serum Main : LH of 8 - 12 mIU/ml Diluent solution : BSA - PBS Preservative : 0.1% Sodium Azide	1 ml × 1 vials (Ready to use)

نکات قابل توجه:

- ۱- در این کیت از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر HBS AG و HIV منفی می باشند.
- ۲- از استفاده مواد بعد از تاریخ انقضاء خود داری فرمائید.
- ۳- از مخلوط کردن با کیت های تاریخ گذشته اجتناب ورزید.
- ۴- درب ظروف را بدرستی بر روی ویال خود ببندید.
- ۵- از لباس و دستکش یکبار مصرف برای کار با مواد رادیو اکتیو استفاده کنید.

- ۶- لوازم آزمایشگاهی آلوده به مواد رادیو اکتیویته را بوسیله روش های مراقبت در برابر اشعه و روش های ایمن شستشو و پسماند نمایید.
- ۷- معرف ها باید قبل از مصرف به دمای اتاق یا محیط برسند.
- ۸- هرگز محلول کیت هایی که دارای LOT متفاوتی هستند با هم مخلوط نکنید.

تهیه و جمع آوری نمونه:

این تست را می توان مستقیم بر روی نمونه های سرم انسانی یا پلاسما انجام داد ولی تأکید می شود که از انجام آزمایش بر روی نمونه های سرمی همولیز و لیپمیک و ایکتریک خود داری فرمائید. اگر قرار است آزمایش در طی ۲-۳ روز بعد انجام شود بهتر است در یخچال در دماهای ۲-۸ درجه سانتیگراد و برای اهداف طولانی مدت ۱۵-۱۰ روز، باید در دمای ۲۰-۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری و از انجماد و ذوب مکرر خودداری شود. برای جلوگیری از ایجاد واکنش های تداخل گر برای هر تست از یک سمپل استفاده کنید. معرف ها باید قبل از آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط قرار بگیرند. نمونه هایی که فریز بوده اند باید بعد از ذوب شدن در دمای محیط توسط شیکر به صورت هموژن و یکنواخت درآیند. بهتر است که برای انجام آزمایش بصورت دوپل یا دوتایی استفاده شود و از میانگین آنها به جواب صحیح برسید.

اثر هوک: زمانیکه نمونه های حاوی غلظت های بالای آنتی ژن LH بصورت رقیق نشده با این روش آزمایش می شوند در اثر پدیده هوک مقادیر پائین تر از غلظت حقیقی بدست می آید. در این کیت پدیده هوک تا میزان 2000mIU/ml دیده نشد.

محاسبه نتایج:

- ۱- با استفاده از میانگین شمارش استانداردها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) بر روی کاغذ میلیمتری، منحنی استاندارد رسم کنید.
- ۲- میانگین شمارش برای هر نمونه را بدست آورید و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی استاندارد وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X ها ایجاد می شود که بیانگر میزان غلظت نمونه است.

مقادیر طبیعی:

مقادیر طبیعی در سرم افراد نرمال که توسط آزمایش های مکرر به روش رادیو ایمونومتریکی اسه بدست آمده است به قرار زیر است:

LH	Median(mIU/ml)	Central 95% range(mIU/ml)	No.
Adult male	3.4	0.8 - 11.1	106
Adult female			
Follicular phase	2.7	1.0 - 7.9	126
Midcycle	30.4	10.1 - 55.9	10
Luteal phase	1.6	0.8 - 7.0	119
Oral contraceptive	1.8	Nondetectable(ND) - 6.2	18
Postmenopausal(>50yr)	13.8	3.1 - 41	35
Prepubertal (1-3 yr)	-	0 - 0.6	44

حساسیت:

حداقل غلظت سرمی قابل اندازه گیری با این روش در مقایسه با استاندارد 0 میزان 0.22 mIU/ml است.

اختصاصی بودن:

در این تست علامت مشخصی از واکنش متقاطع بین میزان بالای FSH - HCG و TSH مشاهده نشده است.

دقت:

برای ارزیابی دقت تست اعم از تکرارپذیری و تولید دوباره (inter and intra Assay) روی ۳ سرم با غلظت مشخص FSH انجام می شود.

Sample	Intra assay		Inter assay		n
	Mean ± SD(mIU/ml)	C.V.(%)	Mean ± SD(mIU/ml)	C.V.(%)	
1	5.23 ± 0.31	5.90	5.08 ± 0.30	5.83	5
2	79.79 ± 1.37	1.72	80.30 ± 1.51	1.86	
3	151.02 ± 1.22	0.81	150.79 ± 1.65	1.09	

*C.V = S.D of Sample (mIU/ml)/Mean of sample (mIU/ml)×100

ریکاروری:

برای انجام ریکاروری دو نمونه سرم با غلظت مشخص را به سه استاندارد مختلف (50 - 5 mIU/ml) اضافه می کنیم. دو نمونه سرم:

حداقل غلظت 10.8 mIU/ml و متوسط غلظت 60.2 mIU/ml

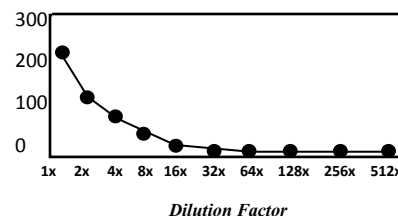
Sample (mIU/ml)	Added (mIU/ml)	Expected Value (mIU/ml)	Calculated Value (mIU/ml)	Recovery (%)
10.8	5	7.87	7.51	95.4
	50	30.37	28.50	93.8
	100	55.37	57.70	104.2
60.2	5	32.57	31.25	95.4
	50	55.07	52.11	94.6
	100	80.07	84.60	105.7

*Recovery(%) = Calculated value (mIU/ml)/Expected value(mIU/ml)×100

آزمایش خطی بودن:

با رقیق سازی یک نمونه سرم با محلول BSA به میزان ۵٪ نتایج زیر بدست آمده است:

Dilution Factor	Conc. (mIU/ml)
Undiluted	674.8
1:2	337.4
1:4	168.1
1:8	83.7
1:16	43.0
1:32	21.6
1:64	10.6
1:128	5.3
1:256	2.9
1:512	1.4



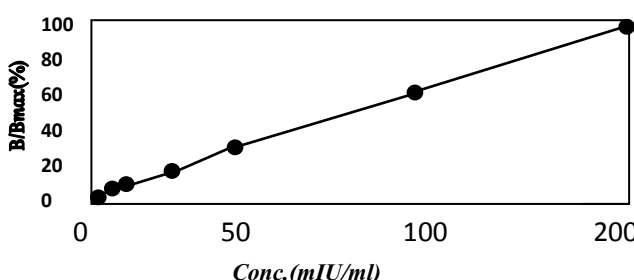
نمودار استاندارد:

برای محاسبه درصد اتصال رادیو اکتیویته کنترل، استاندارد و نمونه ها از فرمول زیر محاسبه می شوند:

DESCRIPTION	CPM	B/Bmax(%)	Conc. (mIU/ml)
Total Activity	293107		
Std 1	0 mIU/ml	215	0.2
Std 2	2 mIU/ml	1235	1.1
Std 3	5 mIU/ml	3599	3.2
Std 4	20 mIU/ml	7901	7.0
Std 5	50 mIU/ml	17950	16.0
Std 6	100 mIU/ml	59952	53.5
Std 7	200 mIU/ml	112164	100
Control Serum	5124	10.2	10.3

*B/Bmax(%) = Solid phase cpm/ Standard 200(mIU/ml) cpm×100

Standard Curve for LH



روش کار:

① تعداد لوله های کوت شده را برای استاندارد، کنترل و نمونه دوپل یا دوتایی قرار دهید. برای شمارش تمام از لوله های معمولی استفاده می شود.

② 50λ از استانداردها، کنترل سرم و نمونه بیمار را به داخل هر لوله اضافه می کنیم. (به جز لوله توتال).

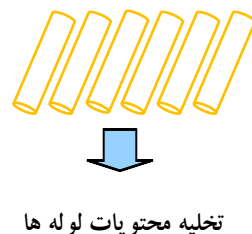
③ 50λ از ردیاب یا Tracer به تمام لوله ها اضافه می کنیم.

نکته: برای غلظت های بالاتر از 200mIU/ml باید با رقیق کننده به نسبت 1 به 5 یا 1 به 10 رقیق شود و بعد از بدست آوردن نتایج با دستگاه گاما کانتر، در ضریب رقت ضرب شود.

④ حبابگیری: لوله ها را به آرامی به مدت 15 ثانیه تکان داده تا محتویات به خوبی مخلوط شوند و سپس لوله ها را به مدت 30 دقیقه در حرارت اتاق بر روی شیکر 200rpm انکوبه نمایید. (به جز لوله توتال)

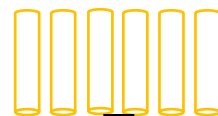
30 دقیقه روی شیکر 200 RPM

⑤ ابتدا محتویات لوله ها را از طریق وارونه کردن یا مکش تخلیه کنید. (به جز لوله توتال)



تخلیه محتویات لوله ها

⑥ ابتدا محتویات لوله ها تخلیه سپس با 2cc آب مقطر به جز لوله توتال، 2 مرتبه شستشو می دهیم و با مکنده یا معکوس کردن و ثابت نگهداشتن به مدت 2 دقیقه محتویات خالی می شوند. (به جز لوله توتال)



تخلیه محتویات لوله



شستشو با آب مقطر به حجم 2cc (2 مرتبه)

⑦ با استفاده از دستگاه گاما کانتر ظرف مدت 1 دقیقه اکتیویته موجود در لوله ها خوانده می شود.



References:

SAWYER-STEFFAN J.E., LASLEY B.L., HOFF J.D., YEN S.S.C. (1982)
Comparison of in-vitro bioactivity and immunoreactivity of serum LH in normal cyclic and hypogonadal women treated with low doses of LH-RH.
J. Reprod. Fertil., 65:45

THOMAS C.M.G., SEGERS M.F.G. (1988)
Measurement of Serum hLH: hCG interference evaluated for two hLH-Specific IRMA kits.
Clin. Chem., 34:768

LOUMAYE E., VANKRIEKEN L., DEPREESTER S., PSALTI I., de COOMAN S., THOMAS K. (1989)
Hormonal changes induced by short-term administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and their consequences for embryo development.
Fertil. and Steril., 51:105

	Used by	<input type="checkbox"/> LOT	Batch code
	Temperature limitation	<input type="checkbox"/> CONTROL	Control
	Store between	<input type="checkbox"/> CAL	Standard
	Cautions, consult accompanying documents	<input type="checkbox"/> CT	Coated Tube
	Biological risk	<input type="checkbox"/> TRAC	Tracer
	Consult instructions for use	<input type="checkbox"/> WASHB	Wash Buffer
	In vitro diagnostic medical device		Radioactive material
	Manufacturer	<input type="checkbox"/> REF	Catalogue number

آدرس کارخانه:

شهرک صنعتی اشتهارد - بلوار ابوریحان بیرونی - بلوار غزالی غربی - لادن 2 - شرکت پادیاب طب

تلفن: 026-37775529 - 37775522 - 026

فکس: 026-37775529

پشتیبانی فنی: 09128930048

دفتر مرکزی: تهران - 24 متری سعادت آباد - خیابان یکم شرقی - خیابان شب بو شرقی - پلاک 17 - طبقه 2

آدرس اینترنتی: www.padyabteb.com

ایمیل شرکت: info@padyabteb.com



شرکت پادیاب طب
تلفن سوالات فنی: 09128930048