

کیت اندازه‌گیری هورمون Estradiol در سرم انسان
Estradiol ELISA kit 96t
Cat No: 2824-96 / Rev: B4 (1404/09/08)

مقدمه:

هورمون استرادیول (17β -estradiol) یک ترکیب استروئیدی ۱۸ کربنه است که در آقایان توسط بیضه و در خانمها توسط فولیکولهای تخمدان، جسم زرد، قشر آدرنال و جفت ترشح می‌شود. اندازه‌گیری سطح سرمی استرادیول در بررسی عملکرد تخمدان، مشکلات قاعدگی و نازایی اهمیت دارد. افزایش این هورمون در سندرم زن‌نمایی، بلوغ زودرس، هیپرتیروئیدیسم و سرطان تخمدان، سرطان بیضه و سرطان آدرنال مشاهده می‌شود و کاهش آن نیز در کم‌کاری هیپوفیز، سندرم ترنز، هیپوگنادیسم و یائسگی رخ می‌دهد. حیطة کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی سطح استرادیول در نمونه سرم یا پلاسما می‌باشد.

اصول آزمایش:

این آزمایش بر اساس الیزای رقابتی طراحی شده است و بی‌حرکت سازی کمپلکس ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در سطح چاهک و آنتی‌بادی بیوتینیله مونوکلونال ضد استرادیول صورت می‌گیرد. نمونه‌های سرم و کالیبراتورها که حاوی استرادیول غیر کونژوگه هستند به همراه آنتی‌بادی بیوتینیله به چاهک‌ها اضافه می‌شوند و سپس، استرادیول کونژوگه (متصل به آنزیم HRP) درون چاهک‌ها ریخته می‌شود. به این ترتیب، استرادیول کونژوگه برای اتصال به جایگاه‌های محدود آنتی‌بادی (که در مرحله اول مصرف نشده‌اند) با استرادیول موجود در نمونه رقابت می‌کند. پس از شستشوی چاهک‌ها، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که بیشترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد. شدت جذب نوری با غلظت استرادیول نمونه‌ها رابطه معکوس دارد. در نهایت سطح استرادیول نمونه‌ها توسط منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
 - ۲) کالیبراتور (Estradiol Cal A-G): هفت ویال با غلظت‌های ۰، ۲۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰ pg/mL تهیه شده از سرم انسان.
 - ۳) محلول کونژوگه آنزیمی (Estradiol Enzyme Conjugate): یک ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌ژن متصل به آنزیم HRP در بافر.
 - ۴) محلول کونژوگه بیوتینی (Estradiol Biotin Conjugate): یک ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی متصل به بیوتین در بافر.
 - ۵) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
 - ۶) محلول رنگزا (Substrate Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
 - ۷) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
 - ۸) محلول کنترل (Estradiol control): ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری.
 - ۹) برچسب مخصوص پلیت: یک ورق.
- توجه ۱: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.
- توجه ۲: مقادیر کنترل (ها) در COA درج گردیده است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

- ۱) دستگاه خوانش گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
- ۲) سمپلر کالیبره.
- ۳) آب مقطر دیونیزه.

احتیاط در استفاده از کیت:

- ۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
- ۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.
- ۳) توجه فرمایید که محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.

۴) محتویات این کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2، HBS، Ag و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین با توجه به احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شوند.

۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است و در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری نمایید.

۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

۱) نمونه مناسب برای این تست سرم یا پلاسما می‌باشد. ناشتا بودن فرد به‌هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.

۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین ($>5 \text{ mg/day}$) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.

۳) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. تا ۵ روز می‌توان نمونه‌ها را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری نمایید.

آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:

۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت، کنترل‌ها و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند کالیبراتورها، کنترل‌ها و نمونه‌ها را ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت کنید.

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک‌ها را به‌همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب

آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، کنترل و نمونه‌ها در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.

۳) حجم ۵۰ میکرولیتر کونژوگه بیوتینی به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) حجم ۵۰ میکرولیتر کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۶) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۷) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید.

سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده، (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بریزید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت اقدام نمایید.






۸) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ بدست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به‌مدت ۱۵ دقیقه افزایش دهید.

1. <http://www.idealdiag.com/Training.aspx>

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد. مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

| | |
|---|---|
| EC REP | Authorized representative in the European community |
|  | Manufacturer |
|  | Use-by date |
| LOT | Batch code |
| IVD | In vitro diagnostic medical device |
| CE | European conformity |
| REF | Catalogue number |
|  | Contains sufficient for tests |
|  | Temperature limit |
|  | Date of manufacture |

References:

- McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
 - Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
 - Tietz. Reference information for the clinical laboratory. Hn Textbook of clinical chemistry. Burtis, CA, Ashwood, RA, WB, Saunders. Philadelphia; 1999.
- در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.
- توجه:** چنانچه از دستگاه‌های ایژا پروسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.

۴) بررسی درستی - آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست غلظت استرادیول در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 10\%$ است.

| No. | Sample (pg/mL) | % Bias | | | |
|-----|----------------|--------|------|------|------|
| | | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 |
| 1 | 135.6 | 2.8 | 1.1 | 2.7 | 1.9 |
| 2 | 155.4 | 3.1 | -2.2 | 1.1 | -3.4 |
| 3 | 187.3 | -1.6 | 1.5 | -1.3 | -2.5 |

۵) بررسی ویژگی - آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)

ویژگی این آزمایش با اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مندرج در جدول زیر به نمونه سرم و اندازه‌گیری واکنش متقاطع آن‌ها با استرادیول بررسی شد. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده $100 \pm 10\%$ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

| Analyte | Cross Reactivity |
|---------------------|------------------|
| Androstenedione | 0.0003 |
| Dihydrotestosterone | 0.0008 |
| Cortisone | <0.0001 |
| Corticosterone | <0.0001 |
| Cortisol | 0.0004 |
| Estriol | <0.0001 |
| DHEA-S | <0.0001 |
| Estrone | <0.0001 |
| Testosterone | <0.0001 |

۶) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با $۸/۳ \text{ pg/mL}$ تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

$$LOB = \text{Mean}_b + 1.645 SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

۷) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

| Normal Range (pg/mL) | |
|--------------------------------|-----------|
| Females (Follicular Phase) | 9 - 175 |
| Females (Luteal Phase) | 44 - 196 |
| Females (Periovulatory) | 107 - 281 |
| Females (Treated Menopausal) | 42 - 289 |
| Females (Untreated Menopausal) | ND - 20 |
| Females (Oral Contraceptives) | ND - 103 |
| Males | 4 - 94 |

• ND: Not Detectable

پارامترهای کنترل کیفی

۱) بررسی دقت - آزمون دقت درون‌دور (Within-Run)

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 11.2\%$ است.

| Serum Sample | 1 | 2 | 3 |
|------------------------|------|-------|-------|
| No. of Repeats | 20 | 20 | 20 |
| Mean Estradiol (pg/mL) | 37.4 | 138.2 | 234.0 |
| SD (pg/mL) | 2.0 | 6.4 | 10.3 |
| CV (%) | 5.3 | 4.6 | 4.4 |

۲) بررسی دقت - آزمون دقت بین‌دور (Between-Run)

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه) در هر نوبت کاری انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 11.2\%$ است.

| Serum Sample | 1 | 2 | 3 |
|------------------------|------|-------|-------|
| No. of Repeats | 20 | 20 | 20 |
| Mean Estradiol (pg/mL) | 25.9 | 114.1 | 216.3 |
| SD (pg/mL) | 1.4 | 5.6 | 9.9 |
| CV (%) | 5.4 | 4.9 | 4.5 |

۳) بررسی درستی - آزمون بازیابی (Recovery)

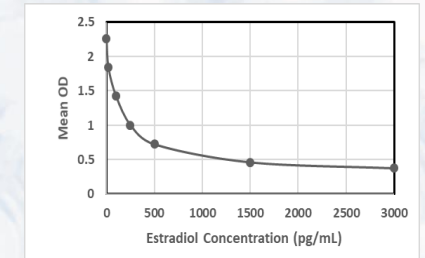
در این تست به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به عنوان یک نمونه، غلظت استرادیول در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش، $Bias < 10\%$ نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

| No. | Sample (pg/mL) | Added (pg/mL) | Exp. (pg/mL) | Obs. (pg/mL) | % Rec. |
|-----|----------------|---------------|--------------|--------------|--------|
| 1 | 23.3 | 31.5 | 27.4 | 26.5 | 96.7 |
| 2 | 15.4 | 42.2 | 28.8 | 29.2 | 101.4 |
| 3 | 58.0 | 114.6 | 86.3 | 89.0 | 103.1 |

(۹ حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

(۱۰ شدت جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر، حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). در این آزمایش محاسبه غلظت به روش Point to Point و 4PL (یا Logic-log) قابل اجرا است؛ در صورت استفاده از روش 4PL غلظت کالیبراتور A را عددی کوچک (به عنوان مثال 0.01 pg/mL) در نظر بگیرید. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

| Calibrator | Well Number | OD | Mean OD | Conc. (pg/mL) |
|------------|-------------|-------|---------|---------------|
| Cal. A | A1 | 2.264 | 2.255 | 0 |
| | B1 | 2.247 | | |
| Cal. B | C1 | 1.857 | 1.839 | 20 |
| | D1 | 1.821 | | |
| Cal. C | E1 | 1.436 | 1.424 | 100 |
| | F1 | 1.412 | | |
| Cal. D | G1 | 1.010 | 1.004 | 250 |
| | H1 | 0.998 | | |
| Cal. E | A2 | 0.735 | 0.725 | 500 |
| | B2 | 0.715 | | |
| Cal. F | C2 | 0.491 | 0.463 | 1500 |
| | D2 | 0.435 | | |
| Cal. G | E2 | 0.394 | 0.385 | 3000 |
| | F2 | 0.376 | | |



مقادیر مورد انتظار برای تست ایژای استرادیول

شرکت تولید کننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر باید برای آنالیت مورد نظر توسط آزمایشگاه تعیین گردد.