

کیت اندازه‌گیری **17a-OH Progesterone** در سرم انسان
17a-OH Progesterone ELISA Kit 96t
 Cat. No: 2724-96 / Rev: C5 (1405/02/26)

مقدمه:

۱۷-آلفاهیدروکسی پروژسترون (17a-OHP) یک هورمون استروئیدی است که توسط غده آدرنال تولید می‌شود و اندازه‌گیری سطح سرمی آن در تشخیص اولیه هیپرپلازی ارثی آدرنال (CAH) اهمیت دارد. تشخیص سریع CAH در نوزادان مبتلا، بسیار ارزشمند است زیرا تشخیص دیر هنگام این اختلال می‌تواند باعث بروز حالت‌های تغییر جنسیت در نوزادان دختر و گسترش رفتارهای ثانویه جنسی در پسر بچه‌ها شود. سطح 17a-OHP در سرم نوزادان نارس تا حدود ۲-۳ برابر مقدار طبیعی افزایش می‌یابد و بنابراین، تعریف یک سطح نرمال متفاوت جهت گزارش سطح 17a-OHP در نوزادان نارس پیشنهاد می‌شود. حیطه کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی سطح هورمون 17a-OHP در نمونه سرم یا پلاسمای هپارینه انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این آزمایش بر اساس الایزای رقابتی طراحی شده است. بی‌حرکت‌سازی کمپلکس‌های ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهک و آنتی‌بادی بیوتینیل‌شده صورت می‌پذیرد. نمونه‌های سرم و کالیبراتورها (حاوی آنتی‌ژن آزاد و بیوتینیل‌شده در چاهک‌ها ریخته می‌شوند. آنتی‌ژن‌ها برای اتصال به آنتی‌بادی بیوتینیل‌شده ضد 17a-OHP که به استرپتاویدین کف چاهک متصل شده است با یکدیگر رقابت می‌کنند. پس از تخلیه و شستشوی چاهک‌ها، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که بیشترین میزان جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد. میزان رنگ تولید شده و شدت جذب نوری هر چاهک با غلظت 17a-OHP نسبت معکوس دارد. در نهایت، غلظت این هورمون در نمونه‌ها توسط منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

(۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.

(۲) کالیبراتور (17a-OHP Cal A-G): هفت ویال با غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۱۰۰ و ۲۰ ng/mL، تهیه شده از سرم انسان.

(۳) محلول کوئوگه آنزیمی (17a-OHP Enzyme Conjugate): یک ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌ژن متصل به آنزیم HRP در بافر.

(۴) محلول کوئوگه بیوتینی (17a-OHP 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 A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.

(۷) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.

(۸) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.

(۹) محلول کنترل (17a-OHP Control): ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری.

(۱۰) برچسب مخصوص پلیت: یک ورق.

توجه ۱: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند.

توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در COA درج شده 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 کنید.

(۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.

(۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.

(۴) محتویات این کیت با منشأ انسانی از نظر منفی بودن HBSAg، HIV1/2 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 و از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری کنید.

(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 و آماده‌سازی نمونه:

(۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم یا پلاسمای هپارینه است. ناشتا بودن فرد به هنگام 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 کنید.

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.

(۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: قبل از شروع استفاده از کیت، کل حجم محلول رنگزا B (ویال روشن) را داخل محلول رنگزا A (ویال تیره) خالی نمایید و برای انجام تست تا پایان مصرف کیت استفاده نمایید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. نمونه‌ها، کنترل‌ها و کالیبراتورها را با 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 ۸-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید.

(۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و یا کنترل را 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 از محلول کوئوگه آنزیمی به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید.

(۴) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول کوئوگه بیوتینی به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید.

(۵) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.

(۶) محتویات پلیت را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت^۱ اقدام نمایید.

(۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

(۸) پلیت را به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ بدست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به‌مدت ۱۵ دقیقه افزایش دهید.

(۹) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی 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).

^۱ <http://www.idealdiag.com/Training.aspx>

ISO13485
KGS

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.

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 بررسی شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری نسبت مقدار ماده اضافه شده به مقدار 17α-OHP مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، نشان‌دهنده عدم واکنش متقاطع بود. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده ۱۰±۱۰ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Analyte	Cross Reactivity (%)
17α-OH Progesterone	100.000
progesterone	0.375
Androstenedione	0.158
Cortisone	0.014
Corticosterone	0.347
Cortisol	0.005
Danazol	0.003
Dihydrotestosterone	0.006
DHEA sulfate	0.002
Estradiol	0.004
Estrone	0.003
Estriol	0.002
Prednisone	0.023
Testosterone	0.015
RF	<0.001

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 ۰/۰۸ ng/mL تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

$$LOB = Mean_b + 1.645 SD_b$$

(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.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.

پارامترهای کنترل کیفی

۱) بررسی دقت - آزمون دقت درون دور (Within-Run)

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean 17α-OHP (ng/mL)	0.66	1.68	4.51
SD (ng/mL)	0.04	0.09	0.22
CV (%)	6.1	5.4	4.8

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

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean 17α-OHP (ng/mL)	0.44	2.31	4.08
SD (ng/mL)	0.03	0.15	0.2
CV (%)	6.8	6.4	4.9

۳) بررسی درستی - آزمون بازیابی (Recovery)

در این تست به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و سطح 17α-OHP در ترکیب به‌دست آمده اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش، $Bias < 13.5\%$ نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	% Rec.
1	0.53	3.61	2.07	2.11	101.9
2	2.70	4.14	3.42	3.53	103.2
3	3.85	1.95	2.90	2.80	96.5

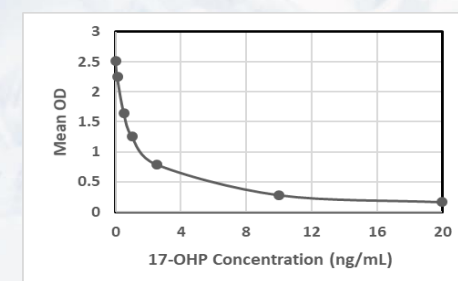
۴) بررسی درستی - آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست، غلظت 17α-OHP در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 13.5\%$ است.

No.	Sample (ng/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	1.9	1.0	2.3	-1.1	-3.2
2	2.8	3.1	4.4	-3.6	-2.2
3	4.7	-2.3	-1.0	-2.4	2.2

در این آزمایش محاسبه غلظت به روش Point to Point و 4PL (یا Logit-log) قابل اجرا است؛ در صورت استفاده از روش 4PL غلظت کالیبراتور A را عددی کوچک (به عنوان مثال 0.01 ng/mL) در نظر بگیرد. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (ng/mL)
Cal. A	A1	2.564	2.521	0
	B1	2.478		
Cal. B	C1	2.268	2.251	0.1
	D1	2.235		
Cal. C	E1	1.667	1.650	0.5
	F1	1.634		
Cal. D	G1	1.259	1.253	1
	H1	1.247		
Cal. E	A2	0.798	0.792	2.5
	B2	0.786		
Cal. F	C2	0.298	0.281	10
	D2	0.264		
Cal. G	E 2	0.174	0.163	20
	F 2	0.153		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای 17α-OHP

شرکت تولیدکننده 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.

Normal Range (ng/mL)	
Prepubertal Child (1-10 years)	0.2 – 0.8
Adult Man	0.2 – 3.1
Follicular Phase (Adult Woman)	0.4 – 1.51
Luteal Phase (Adult Woman)	1 – 4.51
Postmenopausal woman	0.2 – 0.9