

کیت اندازه‌گیری Progesterone در سرم انسان
Progesterone ELISA Kit 96t
 Cat. No: 2524-96 / Rev: B5 (1404/09/08)

مقدمه:

پروژسترون یکی از هورمون‌های استروئیدی است که نقش مهمی در آماده‌سازی رحم برای لانه‌گزینی جنین و تداوم بارداری دارد. مقادیر مختلفی از این هورمون توسط جسم زرد (در تخمدان خانم‌های غیر باردار)، جفت، قشر غده آدرنال و بیضه‌ها ترشح می‌شود. تبدیل کلسترول به پرتگنولون پیش‌ساز لازم برای سنتز پروژسترون را فراهم می‌نماید. اندازه‌گیری پروژسترون در تعیین زمان تخمک‌گذاری، ارزیابی وضعیت جفت در حاملگی‌های پرخطر، بررسی کیست‌های لوتئال تخمدان، سندروم کوشینگ، کوریوکارسینوما تخمدان و هاپرپلازی آدرنوکورتیکال اهمیت دارد. کاهش مقدار پروژسترون خون در پره اکلامپسی، مسمومیت حاملگی، حاملگی نابجا، نارسایی جفت، آمنوره و کاهش عملکرد تخمدان گزارش شده است. حیطة کاربرد این کیت اندازه‌گیری غلظت پروژسترون در نمونه‌های سرم انسان می‌باشد.

اصول آزمایش:

این آزمایش براساس الی‌زای رقابتی طراحی شده است. بی‌حرکت‌سازی کمپلکس ایمنی در کف چاهک توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهک و آنتی‌بادی‌های بیوتینیل‌شده ضد پروژسترون صورت می‌پذیرد. نمونه‌های سرم و کالیبراتورها که حاوی پروژسترون آزاد و غیرکونژوگه هستند به همراه پروژسترون کونژوگه با آنزیم HRP و آنتی‌بادی بیوتینیل‌شده در چاهک‌ها ریخته می‌شوند. آنتی‌ژن‌ها برای اتصال به آنتی‌بادی بیوتینیل‌شده ضد پروژسترون که به استرپتاویدین کف چاهک متصل شده است با یکدیگر رقابت می‌کنند. پس از تخلیه و شستشوی چاهک‌ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده محصول نهایی تولید می‌شود که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب را دارد. شدت رنگ و میزان جذب با غلظت پروژسترون نمونه و کالیبراتورها، نسبت معکوس دارد. در نهایت غلظت پروژسترون در نمونه‌ها توسط منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکرو پلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
 - ۲) کالیبراتورها (Progesterone Cal A-G): هفت ویال با غلظت‌های ۰، ۰/۳، ۲، ۵، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ ng/mL. تهیه شده از سرم انسان.
 - ۳) کونژوگه آنزیمی (Progesterone Enzyme Conjugate): یک ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌ژن پروژسترون متصل به آنزیم HRP.
 - ۴) کونژوگه بیوتینی (Progesterone Biotin Conjugate): یک ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی ضد پروژسترون متصل به بیوتین.
 - 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 (Progesterone Control): ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری.
 - ۹) برجسب مخصوص پلیت: یک ورق.
- توجه ۱: تمام 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 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 نمایید.
- 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 کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBSAg، HIV1/2 و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق دستورالعمل‌های ایمنی انجام شوند.
- ۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. 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 و آماده‌سازی نمونه:

- ۱) نمونه مناسب برای این تست سرم 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. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. 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.






روش انجام آزمایش:

- قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.
 - ۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام تست را بردارید و بقیه چاهک‌ها را همراه 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، کنترل‌ها یا نمونه‌ها در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.
 - ۳) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید.
 - ۴) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه بیوتینی به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید.
 - ۵) چاهک‌ها را با برجسب مخصوص پلیت بیوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
 - ۶) 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 بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت اقدام نمایید.
 - ۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری فرمایید.
- توجه: اگر بیشترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۵ دقیقه افزایش دهید.

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

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 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 الایزا پرسوسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.

دفتر مرکزی: تهران - بزرگراه آشناسان - سردار جنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۸
 کارخانه: کرج - کمال شهر، شهرک صنعتی بهارستان، انتهای گلستان دوم غربی، پلاک ۱۱ | تلفن: ۰۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹-۲۳

۴) بررسی درستی - آزمون خطی بودن (Linearity)

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

No.	Sample (ng/mL)	% Bias			
		1/2	1/4	1/8	1/16
1	4.3	-1.9	2	-2	0
2	13.7	-2.8	-1.6	1.2	-1.9
3	31.6	-0.7	-2.9	-3.2	-2.3

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

ویژگی این آزمایش به کمک اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مندرج در جدول زیر به نمونه‌های سرم، ارزیابی شده است. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین مقدار ماده اضافه شده به مقدار پروژسترون مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، بررسی شده است. 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 (%)
progesterone	100.000
Androstenedione	0.158
17OH-Progesterone	0.375
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
Estrilol	0.002
Prednisone	0.023
Testosterone	0.015

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 0.112 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.

Reference Interval (ng/mL)	
Prepubertal Child (1-10 Years)	0.07 – 0.52
Adult Man	0.13 – 1.22
Adult Woman	
Follicular Phase	0.15 – 1.40
Luteal Phase	2 – 25
Postmenopausal	0 – 0.8
Pregnant Woman	
First Trimester	7.25 – 90
Second Trimester	19.5 – 91
Third Trimester	49 – 422

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 $CV < 13.2\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean Progesterone (ng/mL)	1.34	27.23	85.1
S.D. (ng/mL)	0.06	1.15	3.65
C.V (%)	4.5	4.2	4.2

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 $CV < 13.2\%$ است.

Serum Sample	1	3	4
No. of Repeats	20	20	20
Mean Progesterone (ng/mL)	3.13	18.90	81.52
S.D. (ng/mL)	0.18	0.86	3.67
C.V (%)	5.7	4.5	4.5

۳) بررسی درستی - آزمون بازیابی (Recovery)

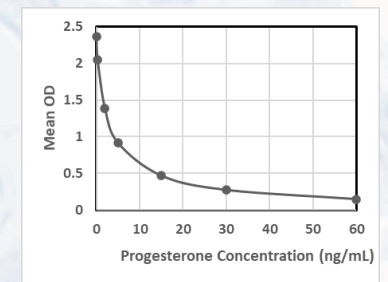
در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به‌عنوان یک نمونه، غلظت پروژسترون در آن سنجش گردید. معیار پذیرش در این آزمایش، $Bias < 10\%$ نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	%Rec.
1	0.91	6.50	3.70	3.61	97.60
2	3.40	18.32	10.86	10.46	96.3
3	11.13	87.21	49.17	49.32	100.3

۸) 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.
 ۹) شدت جذب نوری را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج رفرنس 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 ng/mL) در نظر بگیرید.

میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر ارائه شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (ng/mL)
Cal. A	A1	2.271	2.364	0
	B1	2.457		
Cal. B	C1	1.974	2.052	0.3
	D1	2.130		
Cal. C	E1	1.317	1.384	2
	F1	1.451		
Cal. D	G1	0.865	0.916	5
	H1	0.967		
Cal. E	A2	0.446	0.468	15
	B2	0.490		
Cal. F	C2	0.259	0.273	30
	D2	0.287		
Cal. G	E2	0.141	0.147	60
	F2	0.153		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای پروژسترون

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