

کیت اندازه گیری Progesterone در سرم انسان
Progesterone ELISA Kit 96t
Cat. No: 2524-96 / Rev: A3 (1402/04/17)

مقدمه:

پروژسترون یکی از هورمون های استروئیدی است که نقش مهمی در آماده سازی رحم برای لانه گزینی جنین و تداوم بارداری دارد. مقادیر مختلفی از این هورمون توسط جسم زرد (در تخمدان خانم های غیر باردار)، جفت، قشر غده آدرنال و بیضه ها ترشح می شود. تبدیل کلسترول به پرگنولون پیش ساز لازم برای سنتز پروژسترون را فراهم می نماید. اندازه گیری پروژسترون در تعیین زمان تخمک گذاری، ارزیابی وضعیت جفت در حاملگی های پرخطر، بررسی کیست های لوتئال تخمدان، سندرم کوشینگ، کوریوکاریسینوما تخمدان و هایپرپلازی آدرنوکورتیکال اهمیت دارد. کاهش مقدار پروژسترون خون در پره اکلامپسی، مسمومیت حاملگی، حاملگی نابجا، نارسایی جفت، آمنوره و کاهش عملکرد تخمدان گزارش شده است. حیطه کاربرد این کیت اندازه گیری غلظت پروژسترون در نمونه های سرم انسان می باشد.

اصول آزمایش:

این آزمایش براساس الایزای رقابتی طراحی شده است. بی حرکت سازی کمپلکس ایمنی در کف چاهک توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهک و آنتی بادی های بیوتینیل شده پروژسترون صورت می پذیرد. نمونه های سرم و کالیبراتورها که حاوی پروژسترون آزاد و غیر کوئزوگه هستند به همراه پروژسترون کوئزوگه با آنزیم HRP و آنتی بادی بیوتینیل در چاهک ها ریخته می شوند. آنتی ژن ها برای اتصال به آنتی بادی بیوتینیل ضد پروژسترون که به استرپتاویدین کف چاهک متصل شده است با یکدیگر رقابت می کنند. پس از تخلیه و شستشوی چاهک ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده محصول نهایی تولید می شود 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 نمونه ها توسط منحنی استاندارد (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکرو پلیت حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
 - ۲) کالیبراتورها (Progesterone Cal A-G): هفت ویال با غلظت های ۰، ۰/۳، ۰/۲، ۰/۵، ۱/۵، ۳۰ و ۶۰ ng/mL، تهیه شده از سرم انسان.
 - ۳) کوئزوگه آنزیمی (Progesterone Enzyme Conjugate): یک ویال ۶ میلی لیتری حاوی آنتی ژن پروژسترون متصل به آنزیم HRP.
 - ۴) کوئزوگه بیوتینی (Progesterone Biotin Conjugate): یک ویال ۶ میلی لیتری حاوی آنتی بادی ضد پروژسترون متصل به بیوتین.
 - ۵) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی لیتری.
 - ۶) محلول رنگزا (Substrate Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری.
 - ۷) محلول متوقف کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری.
 - ۸) محلول کنترل (Progesterone Control): ویال (های) ۰/۵ میلی لیتری.
 - ۹) برچسب مخصوص پلیت.
- توجه ۱: تمام محلول ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده 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 کیت ها و یا شماره های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
- ۲) کلیه محلول ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول هایی که تاریخ انقضاء آن ها گذشته است استفاده نکنید.
- ۳) توجه فرمایید محلول ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- ۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBSAg، HIV1/2 و HCV بررسی شده اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی

بودن تمام عوامل عفونی بیماری زا با استفاده از روش های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل های 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، کنترل ها، چاهک ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

- ۱) نمونه مناسب برای این تست سرم یا پلاسما می باشد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه گیری در درستی نتایج به دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
- ۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین (>5 mg/day) را دریافت می کنند، نمونه گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.
- ۳) درب ظرف نمونه ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه ها خودداری کنید.

آماده سازی و نگهداری معرف ها:

- ۱) آماده سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد 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 نمونه ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی گراد) رسیده اند. کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.

۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام تست را بردارید و بقیه چاهک ها را همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

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

۳) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول کوئزوگه آنزیمی به همه چاهک ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول کوئزوگه بیوتینی به همه چاهک ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۵) چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۶) محتویات چاهک ها را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده، (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت گیر بزنید. به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت اقدام نمایید.

۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک ها 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، می توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

علامت استفاده شده در برجسب 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:

1. McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
2. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
3. 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.

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)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
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 ng/mL 0.12 تعیین گردید).

$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

$$LOB = Mean_b + 1.645 SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

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 نوبت‌کاری (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 نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) 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.

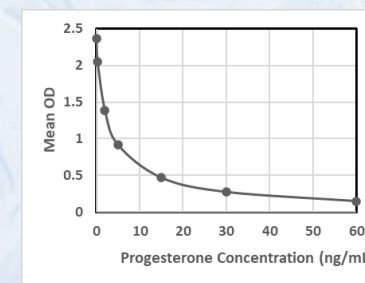
No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	%Rec.
1	0.91	6.50	3.70	3.61	97.60
2	3.40	18.32	10.86	10.46	96.3
3	11.13	87.21	49.17	49.32	100.3

۸) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی 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 ۶۳۰-۶۲۰ 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	E 2	0.141	0.147	60
	F 2	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 مصرف کننده تعیین گردد.