

کیت اندازه‌گیری **17a-OH Progesterone** در سرم انسان  
**17a-OH Progesterone ELISA Kit 96t**  
Cat. No: 2724-96 / Rev: C4 (1404/09/08)

#### 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 استریناویدین تثبیت شده در کف چاهک و آنتی‌بادی بیوتینیله صورت می‌پذیرد. نمونه‌های سرم و کالیبراتورها (حاوی آنتی‌ژن آزاد و غیرکونژوگه)، 17a-OHP کونژوگه با آنزیم HRP و آنتی‌بادی بیوتینیله در چاهک‌ها ریخته می‌شوند. آنتی‌ژن‌ها برای اتصال به آنتی‌بادی بیوتینیله ضد 17a-OHP که به استریناویدین 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 استریناویدین تثبیت شده.

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

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

(۴) محلول کونژوگه 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. 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 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 سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری کنید.

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

(۶) محتویات این کیت با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری کنید.

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

(۸) محتویات این کیت با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری کنید.

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

(۱۰) محتویات این کیت با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری کنید.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### 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 کونژوگه آنزیمی به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید.

(۴) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه 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 اسپراسیون 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 بریزید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت<sup>۱</sup> اقدام نمایید.

(۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرفی‌ها 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).

(۱۱) 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).

(۱۲) 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).

(۱۳) 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).

(۱۴) 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).






(۱۵) 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).

(۱۶) 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).

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

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

<b>EC REP</b>	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
<b>LOT</b>	Batch code
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device
<b>CE</b>	European conformity
<b>REF</b>	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 17 $\alpha$ -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 100 $\pm$ ۱۰ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Analyte	Cross Reactivity (%)
17 $\alpha$ -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
Estrilol	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 0.08 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 17 $\alpha$ -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 17 $\alpha$ -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 اژه هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و سطح 17 $\alpha$ -OHP در ترکیب به دست 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

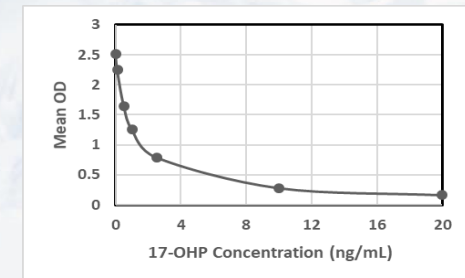
#### ۴) بررسی درستی - آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست، غلظت 17 $\alpha$ -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)	% Bias			
		1/2	1/4	1/8	1/16
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 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 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	E2	0.174	0.163	20
	F2	0.153		



#### مقادیر مورد انتظار برای تست ایژا 17 $\alpha$ -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