

کیت اندازه‌گیری PTH در سرم انسان
PTH ELISA Kit
 Cat. No: 3624-96/ Rev: A3 (1402/09/22)

مقدمه:

هورمون پاراتیروئید (PTH) با طول ۸۴ آمینو اسید در غده پاراتیروئید تولید می‌گردد. تنظیم ترشح این هورمون به صورت نرمال از طریق مکانیسم فیدبک منفی کلسیم سرم بر روی غده پاراتیروئید صورت می‌گیرد. فرم کامل PTH مسئول فعالیت بیولوژیک این هورمون است و با نیمه‌عمری در حدود ۴ دقیقه به سرعت از جریان خون حذف می‌گردد. سنجش فرم کامل PTH در تشخیص افتراقی هایپرپاراتیروئیدی اولیه از سایر موارد غیر وابسته به غده پاراتیروئید مثل بدخیمی‌ها، سارکونیدوز و تیروتوکسیکوز اهمیت دارد و اختصاصی‌ترین راه جهت تشخیص هایپرپاراتیروئیدی اولیه است. حیطه کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی سطح PTH در نمونه سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این کیت به منظور تشخیص کمی فرم کامل PTH به روش الایزا ساندریج و با استفاده از دو نوع متفاوت آنتی‌بادی پلی‌کلونال طراحی شده است. آنتی‌بادی بیوتینیل‌شده میانی و انتهای کربوکسیلی PTH را شناسایی می‌کند و آنتی‌بادی کوئزوگه شده با آنزیم HRP بر علیه انتهای آمینی PTH طراحی شده است. نمونه‌ها به همراه هر دو آنتی‌بادی در چاهک‌های حاوی استرپتاوئیدین تثبیت شده (Immobilized) انکوبه می‌شوند و کمپلکس‌های ایمنی در سطح چاهک‌ها تثبیت می‌گردند. پس از شستشوی چاهک‌ها و با اضافه شدن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) محصول آبی رنگی تولید می‌شود. افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی را به رنگ زرد تبدیل می‌کند که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین جذب نوری را دارد. در نهایت غلظت PTH نمونه به کمک منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاوئیدین تثبیت شده.
 - ۲) کالیبراتور (PTH Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های ۰، ۱۵۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ pg/mL.
 - ۳) محلول کوئزوگه آنزیمی (PTH Enzyme Conjugate): یک ویال ۶ میلی‌لیتری.
 - ۴) محلول کوئزوگه بیوتینی (PTH 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 (PTH Control): ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری.
 - ۹) برچسب مخصوص پلیت.
- 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 نمایید.
- ۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نشود.
- ۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.

۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBS Ag، 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 شود.

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 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 آزمایش سرم است. ناشتا بودن فرد به مدت ۱۲ ساعت 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 صورتیکه امکان انجام آزمایش بلافاصله بعد از نمونه‌گیری وجود نداشته باشد، می‌توان نمونه‌ها را حداکثر تا ۳ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری نمایید.

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

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 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 ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.

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

۴) حجم ۵۰ میکرولیتر کوئزوگه آنزیمی به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۵) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.









۶) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی 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 محلول رنگزا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

۸) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده واکنش به تمام چاهک‌ها اضافه کنید. پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

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

علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

	Manufacturer
	Use-by date
	Batch code
	In vitro diagnostic medical device
	Catalogue number
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

Reference:

- Ryan, WG: Endocrine Disorders – A Pathophysiologic Approach, 2nd Edition Year Book Medical Publishers, Inc. 1980.
- Burtis, C. A., Ashwood, E. R., & Bruns, D. E. (2012). Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. Elsevier Health Sciences.

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با تلفن‌های مندرج بر روی جعبه بخش پشتیبانی تماس بگیرید.

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

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

No.	Sample (pg/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		Bias %			
1	16.50	4.18	-2.87	1.32	4.51
2	59.26	-3.24	-6.20	3.17	-5.22
3	352.10	1.07	-2.30	4.38	-4.64

(۵) 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 $1/0.34 \text{ pg/mL}$ تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645 SD_b$$

$$LOB = Mean_b + 1.645 SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

(۶) 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 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.

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 و سه سطح کنترل در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 13\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean (pg/mL)	4.02	23.14	117.76
SD (pg/mL)	0.27	1.31	5.35
CV (%)	6.7	5.7	4.5

(۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین دور (Between Run)

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت و سه سطح کنترل در ۴ نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت کاری) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 13\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean (pg/mL)	5.46	28.13	106.74
SD (pg/mL)	0.4	1.43	4.31
CV (%)	7.3	5.1	4

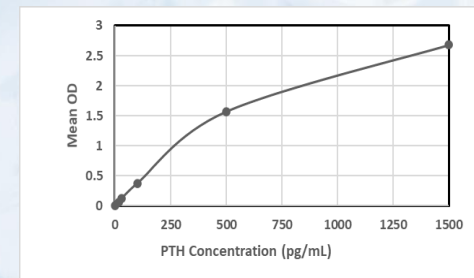
(۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و سطح PTH در ترکیب به دست آمده 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	5.2	106.4	55.8	57.4	102.9
2	5.2	41.4	23.3	22.9	98.3
3	41.4	106.4	73.9	75.8	102.6

(۹) شدت جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از روش Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش اندازه‌گیری نمایید (از طول موج رفرنس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر ارائه شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Value (pg/mL)
Cal. A	A1	0.011	0.01	0
	B1	0.012		
Cal. B	C1	0.055	0.06	15
	D1	0.070		
Cal. C	E1	0.124	0.12	30
	F1	0.132		
Cal. D	G1	0.363	0.373	100
	H1	0.383		
Cal. E	A2	1.561	1.571	500
	B2	1.581		
Cal. F	C2	2.670	2.683	1500
	D2	2.696		


مقادیر مورد انتظار برای تست ایزای PTH

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

Normal Range (pg/ml)
15 - 65