MONOKIT

کیت اندازه‌گیری PTH در سرم انسان به روش الایزا
PTH ELISA Kit 96t
Cat. No: 3634-96 Rev: A1 (1402/09/25)

مقدمه :

هورمون پاراتیروئید (PTH) یک هورمون پروتئینی با طول ۸۴ آمینو اسید است که در غده پاراتیروئید تولید می‌گردد. تنظیم ترشح این هورمون به‌صورت 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 به‌سرعت از جریان خون حذف می‌گردد. سنجش فرم کامل PTH در تشخیص افتراقی هایپرپاراتیروئیدی اولیه از سایر موارد غیر وابسته به غده پاراتیروئید مثل بدخیمی‌ها، سارکوئیدوز 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 براساس الایزای ساندویچ طراحی شده است. بی‌حرکت-سازی کمپلکس‌های ایمنی توسط واکنش بین **استرپتاویدین** تثبیت شده در کف چاهک و آنتی‌بادی بیوتینیله صورت می‌پذیرد. نمونه‌های سرم و کالیبراتورها (حاوی آنتی‌ژن آزاد و غیرکونژوگه)، آنتی‌بادی PTH کونژوگه با آنزیم HRP و آنتی‌بادی بیوتینیله در چاهک‌ها ریخته می‌شوند. با اضافه شدن محلول کونژوگه آنزیمی (حاوی آنتی‌بادی ضد انتهای آمینی PTH کونژوگه شده با آنزیم HRP) به چاهک‌ها، برهمکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی‌ها بدون هیچ رقابتی صورت می‌پذیرد. پس از شستشوی چاهک‌ها و حذف اجزاء متصل نشده، افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی را تولید می‌کند که در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. درنهایت غلظت PTH موجود در هر نمونه توسط منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
۲) کالیبراتور (PTH Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های ۰، ۱۵، ۳۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۵۰۰ pg/mL.
۳) محلول کونژوگه آنزیمی (PTH Enzyme Conjugate): یک ویال ۶ میلی‌لیتری.
۴) محلول کونژوگه 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) بر چسب 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 برگه COA درج شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

۱) دستگاه خوانش‌گر 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 با 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) درصورتیکه 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 بالایی از بیوتین (>5 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:

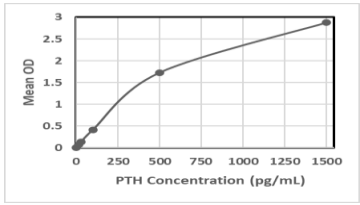
قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت کنید.
۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک‌ها را به‌همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی 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 کونژوگه بیوتینی به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
۴) حجم ۵۰ میکرولیتر کونژوگه آنزیمی به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
۵) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
۶) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت یا آسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) 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[1] اقدام نمایید.
۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت 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 به‌مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود .
۹) شدت جذب نوری هر چاهک را در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از روش Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش اندازه گیری نمایید (از طول‌موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید).

1. http://www.samantajhiz.com/Support.aspx

ISO13485 KGS

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

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (pg/mL)
Cal. A	A1	0.010	0.011	0
	B1	0.012		
Cal. B	C1	0.058	0.066	15
	D1	0.074		
Cal. C	E1	0.128	0.132	30
	F1	0.136		
Cal. D	G1	0.403	0.410	100
	H1	0.417		
Cal. E	A2	1.710	1.728	500
	B2	1.746		
Cal. F	C2	2.869	2.880	1500
	D2	2.891		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای 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

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 و سه سطح کنترل در یک نوبت‌کاری (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)	5.18	21.03	152.39
SD (pg/mL)	0.26	0.96	6.36
CV (%)	5.0	4.6	4.2

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

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

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean (pg/mL)	8.11	32.46	127.84
SD (pg/mL)	0.45	1.43	5.50
CV (%)	5.5	4.4	4.3

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 به‌دست 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	6.3	45.2	25.7	26.4	102.7
2	19.5	43.1	31.3	33.1	105.7
3	156.2	22.1	89.1	90.2	101.2

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	30.23	-3.46	-4.82	-4.67	-381
2	92.10	4.08	3.86	1.18	-4.28
3	305.20	1.27	-1.65	4.70	-3.39

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 با ۱/۰۳۴ pg/mL تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645\ SD_s$$
$$LOB = Mean_b + 1.645\ SD_b$$

(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 به‌صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص‌شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

علائم استفاده شده در برچسب کالاها

	Manufacturer
	Use-by date
LOT	Batch code
IVD	In vitro diagnostic medical device
OBL	Own brand Labeling
Σ	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

1.Carpo L. Cushing syndrome: A review of diagnostic test. *Metabolism*. 25, 955-977 (1979).
2. Wilson JD, Foster DW. (Editors) Williams Textbook of endocrinology. 7th ED WB Saunders
3. Watts NB, Tindall GT. Rapid assessment of corticotropin reserve after pituitary surgery. JAMA, 259, 708. (1988).
4.Burtis CA, Ashwed ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd ed, WB Saunders, Philadelphia. 1825-27 (1994).

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

www.samantajhiz.com
تهران- بزرگراه آبشناسان- سردارجنگل شمالی- خیابان پنج تن- بلوار قدس- کوچه دوم شرقی- پلاک ۸
تلفن : ۰۲۱۸۵۵۱۸۰۰۰