

کیت اندازه گیری هورمون hGH در سرم انسان
hGH ELISA Kit 96t
Cat. No: 5624-96/Rev: B2 (1402/04/17)

مقدمه:

هورمون رشد (GH) یا سوماتوتروپین پلی پپتیدی با دو پیوند دی سولفیدی درون زنجیره ای است که به صورت آزاد یا متصل به پروتئین های حامل در خون گردش می کند. تاکنون چندین ایزوفرم مختلف از هورمون رشد شناسایی شده اند و در این میان، ایزوفرم فعال بیولوژیک با وزن مولکولی حدود ۲۰ کیلو دالتون نقش مؤثری در افزایش رشد ایفا می نماید. اندازه گیری سطح این هورمون در بررسی رشد کودکان، بلوغ جنسی تأخیری، ژیگانتیسم، آکرومگالی و اختلال در فعالیت غده هیپوفیز اهمیت دارد. حیطة کاربرد این کیت، اندازه گیری کمی سطح hGH در نمونه سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این آزمایش براساس الایزای ساندویچ ترتیبی طراحی شده است. با اضافه شدن آنتی بادی بیوتینیل و سرم حاوی آنتی ژن به چاهک، بی حرکت سازی کمپلکس های ایمنی توسط واکنش بین استریتاوپدین تثبیت شده در کف چاهک ها و آنتی بادی بیوتینیل ضد hGH صورت می گیرد. پس از شستشوی چاهک ها، آنتی بادی متصل به آنزیم HRP اضافه شده و کمپلکس های ایمنی تشکیل می شوند. پس از به تعادل رسیدن واکنش و شستشوی مجدد چاهک ها، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی تولید می شود که بیشترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد. مقدار رنگ ایجاد شده و در نتیجه شدت جذب نوری با غلظت hGH سرم، ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت hGH سرم به کمک منحنی استاندارد محاسبه می گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استریتاوپدین تثبیت شده.
- ۲) کالیبراتورها (hGH Cal A-F): با غلظت های ۰، ۰۲، ۰۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۵۰ µIU/mL تهیه شده از سرم انسان.
- ۳) محلول کونژوگه آنزیمی (hGH Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی لیتری حاوی آنتی بادی متصل به آنزیم HRP در بافر.
- ۴) محلول کونژوگه بیوتینی (hGH Biotin Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی لیتری حاوی آنتی بادی متصل به بیوتین در بافر.
- ۵) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی لیتری.
- ۶) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی لیتری.
- ۷) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی لیتری.
- ۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری.

- ۹) محلول کنترل سطح یک (Control Level 1): یک ویال ۵/۰ میلی لیتری.
- ۱۰) محلول کنترل سطح دو (Control Level 2): یک ویال ۵/۰ میلی لیتری.
- ۱۱) 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 گردیده 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 نشود.
- ۳) توجه فرمایید محلول ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- ۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2، HBsAg و HCV بررسی شده اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماریزا 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 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، آماده سازی و نگهداری نمونه:

- ۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم است. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه گیری و نداشتن فعالیت شدید نیم ساعت قبل از 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 گردد. حتی الامکان از نمونه های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نشود.
- 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 ۱ روز در دمای اتاق و تا ۷ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و حداکثر تا ۳ 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 نمایید.
- ۲) آماده سازی محلول رنگزا: محلول های رنگزا A و B را با حجم های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی لیتر از محلول رنگزا B اضافه کنید) و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

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 ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، کنترل ها و نمونه ها را در چاهک های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه، کنترل یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک ها ریخته شود.
- توجه: چاهک اول به عنوان بلانک در نظر گرفته شود. در این چاهک نمونه، کنترل و یا کالیبراتور ریخته نشود. بقیه مراحل با سایر چاهک ها یکسان می باشد.

- ۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه بیوتینی به همه چاهک ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

- ۴) چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- ۵) 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 بریزید. به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت اقدام نمایید.
- ۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی به همه چاهک ها اضافه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری نمایید.
- ۷) چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- ۸) شستشوی چاهک ها را مطابق با بند ۵ تکرار نمایید.
- ۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا آماده مصرف (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری نمایید.
- توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.
- ۱۰) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده به تمام چاهک ها اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.
- ۱۱) مقدار جذب نوری را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید. از طول موج ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (µIU/mL)
Cal. A	A1	0.019	0.022	0
	B1	0.025		
Cal. B	C1	0.069	0.077	2
	D1	0.085		
Cal. C	E1	0.384	0.394	10
	F1	0.404		
Cal. D	G1	0.946	0.970	25
	H1	0.994		
Cal. E	A2	1.619	1.640	50
	B2	1.661		
Cal. F	C2	2.606	2.630	150
	D2	2.654		

علائم استفاده شده در برچسب 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

ندارند. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده $10 \pm 10\%$ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Analyte	Cross Reactivity
Growth Hormone (GH)	1.0000
Luteinizing Hormone (LH)	<0.0001
Follicle Stimulating Hormone (FSH)	<0.0001
Chorionic Gonadotropin (CG)	<0.0001
Thyroid Stimulating Hormone (TSH)	<0.0001
Prolactin Hormone (PRL)	<0.0001

(Sensitivity) بررسی حساسیت

حساسیت کیت بر اساس Limit of Blank و Limit of Detection (LOD) (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با $0.13 \mu\text{IU/mL}$ تعیین گردید.

$$\text{LOD} = \text{LOB} + 1.645 \text{ SD}_s$$

$$\text{LOB} = \text{Mean}_b + 1.645 \text{ SD}_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

(۹) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۳ 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 ۱۸ ماه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد 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 این آزمایش‌ها تغییر OD کالیبراتورها کمتر از ۲۰ درصد است.

(۳) بررسی درستی - آزمون بازیابی (Recovery)

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

No.	Sample ($\mu\text{IU/mL}$)	Added ($\mu\text{IU/mL}$)	Exp. ($\mu\text{IU/mL}$)	Obs. ($\mu\text{IU/mL}$)	% Rec.
1	4.5	23.2	13.85	13.46	97.2
2	23.2	67.4	45.3	44.5	98.2
3	67.4	4.5	35.95	36.72	102.1

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

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

No.	Sample ($\mu\text{IU/mL}$)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
		% Bias				
1	14.2	-3.8	3.7	-2.8	-5.1	-2.3
2	32.8	2.8	2.2	-4.7	-2.9	-3.5
3	68.6	4.8	2.5	5.6	-3.1	-4.9

(۵) بررسی درستی - مقایسه روش‌ها (Comparison of Methods)

جهت بررسی درستی نتایج این کیت، میزان hGH در ۱۰۰ نمونه سرم با مقادیر پایین، نرمال و بالا اندازه‌گیری شد و نتایج آن با کیت مرجع مقایسه و ضریب همبستگی بین نتایج به دست آمده از دو کیت، بر اساس روش پیرسون، ۰/۹۹۸ محاسبه گردید. معیار پذیرش برای این آزمایش به صورت زیر تعریف شده است:

$$0.9 \leq \text{Pearson Correlation Coefficient} \leq 1.0$$

(۶) بررسی تداخلات (Interference)

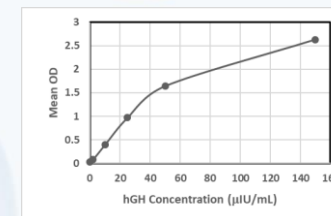
بر اساس فرمول زیر درصد تداخلات رایج در سنجش hGH مورد ارزیابی قرار گرفت:

$$\% \text{ تداخل} = \frac{\text{میانگین غلظت قبل از افزودن آنالیت مداخله گر} - \text{میانگین غلظت بعد از افزودن آنالیت مداخله گر}}{\text{غلظت آنالیت مداخله گر}} \times 100$$

بر اساس نتایج بدست آمده هموگلوبین و تری‌گلیسرید تا ۵۰۰ و بیلی‌روبین تا ۳۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر تأثیری بر نتیجه سنجش ندارند؛ ولی به طور عمومی توصیه بر این است که از نمونه‌های لیز شده و لیپمیک استفاده نشود.

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

واکنش متقاطع ترکیبات مشابه با hGH توسط اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از این ترکیبات به سرم و اندازه‌گیری نسبت بین مقدار ماده مداخله‌گر به مقدار hGH مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، سنجش شد. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که این ترکیبات با آنتی‌بادی hGH واکنش متقاطع



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای hGH

به دلیل ترشح ضربانی و عدم یکنواختی ترشح هورمون رشد، تعیین محدوده مرجع برای مقادیر پایه آن بی‌معنا می‌باشد. با این حال، 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.

جمعیت بالغین نرمال	0-55 ($\mu\text{IU/mL}$)
$1 \mu\text{IU/mL} = 0.333 \text{ ng/mL}$	

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 $\text{CV} < 10\%$ است.

Sample / Control	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean ($\mu\text{IU/mL}$)	13.6	34.3	99.4
SD ($\mu\text{IU/mL}$)	0.8	1.8	4.5
CV (%)	5.9	5.2	4.5

(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 $\text{CV} < 10\%$ است.

Sample / Control	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean ($\mu\text{IU/mL}$)	14.9	27.1	121.9
SD ($\mu\text{IU/mL}$)	0.9	1.5	5.9
CV (%)	6	5.5	4.8