

کیت اندازه‌گیری هورمون hGH در سرم انسان
hGH ELISA Kit 96t
 Cat. No: 5624-96/Rev: B3 (1402/09/22)

مقدمه:

هورمون رشد (GH) یا سوماتوتروپین پلی‌پپتیدی با دو پیوند دی‌سولفیدی درون زنجیره‌ای است که به صورت آزاد یا متصل به پروتئین‌های حامل در خون گردش می‌کند. تاکنون چندین ایزوفرم مختلف از هورمون رشد شناسایی شده‌اند و در این میان، ایزوفرم فعال بیولوژیک با وزن مولکولی حدود ۲۰ کیلو دالتون نقش مؤثری در افزایش رشد ایفا می‌نماید. اندازه‌گیری سطح این هورمون در بررسی رشد کودکان، بلوغ جنسی تأخیری، ژیگانتیسم، آکرومگالی و اختلال در فعالیت غده هیپوفیز اهمیت دارد. حیطة کاربرد این کیت، اندازه‌گیری 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 آنتی‌بادی بیوتینیل و سرم حاوی آنتی‌ژن به چاهک، بی‌حرکت‌سازی کمپلکس‌های ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهک‌ها و آنتی‌بادی بیوتینیل ضد hGH صورت می‌گیرد. پس از شستشوی چاهک‌ها، آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP اضافه شده و کمپلکس‌های ایمنی تشکیل می‌شوند. پس از به تعادل رسیدن واکنش و شستشوی مجدد چاهک‌ها، با افزودن محلول رنگزا (سوسپنشن آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود 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 می‌گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
- ۲) کالیبراتورها (A-F hGH Cal): با غلظت‌های ۰.۲، ۰.۱۰، ۰.۲۵، ۰.۵۰ و ۱۵۰ $\mu\text{IU/mL}$ تهیه شده از سرم انسان.
- ۳) محلول کونژوگه آنزیمی (hGH Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP در بافر.
- ۴) محلول کونژوگه بیوتینی (hGH Biotin Conjugate): یک ویال ۱۱ 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 سطح یک (Control Level 1): یک ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.
 - ۱۰) محلول کنترل سطح دو (Control Level 2): یک ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.
 - ۱۱) برچسب مخصوص پلیت.
- توجه ۱: تمام محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است. توجه ۲: مقادیر کنترل‌ها 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 کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
- ۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضای کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضای آن‌ها گذشته است استفاده نشود.
- ۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- ۴) محتویات کیت با منشأ انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2, HBsAg 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 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، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به عنوان 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 هنگام نمونه‌گیری و نداشتن فعالیت شدید نیم ساعت قبل از نمونه‌گیری در درستی نتایج به دست 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 گردد. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نشود.
- در افرادی که دوز بالایی از بیوتین ($>5 \text{ mg/day}$) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.
- درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۱ روز در دمای اتاق و تا ۷ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا ۳ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.

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 بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری نمایید.
- ۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزای A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B اضافه کنید) و به‌مدت 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 نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.
- ۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام تست را بردارید و بقیه چاهک‌ها را همراه 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، کنترل‌ها و نمونه‌ها را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه، کنترل یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.
- ۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه بیوتینی به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
- ۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

- ۵) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت اقدام نمایید.
- ۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی به همه چاهک‌ها اضافه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری نمایید.

- ۷) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

- ۸) شستشوی چاهک‌ها را مطابق با بند ۵ تکرار نمایید.

- ۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت 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 به‌دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به‌مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.
- ۱۰) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به تمام چاهک‌ها اضافه نمایید و پلیت را به‌مدت 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 مدت 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. ($\mu\text{IU/mL}$)
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		

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

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

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 تلفن های مندرج بر روی جعبه بخش پشتیبانی تماس بگیرید.

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 25 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 Detection (LOD) و Limit of Blank (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)

(Stability) بررسی پایداری

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت 4 هفته در دمای 37 درجه سانتی گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلولها به مدت 8 هفته در دمای 4 درجه سانتی گراد.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری 8 عدد کیت به مدت 2 سال در دمای 4 درجه سانتی گراد قرار داده شد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می باشد.

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می دهد که کیت مورد نظر به مدت 18 ماه پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از 20 درصد است.

(Recovery) بررسی درستی - آزمون بازیابی

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

(Linearity) بررسی درستی - آزمون خطی بودن

در این تست غلظت hGH در رقت های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $\text{Bias} < 10\%$ است.

No.	Sample ($\mu\text{IU/mL}$)	% Bias				
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
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

(Comparison of Methods) بررسی درستی - مقایسه روش ها

جهت بررسی درستی نتایج این کیت، میزان hGH در 100 نمونه سرم با مقادیر پایین، نرمال و بالا اندازه گیری شد و نتایج آن با کیت مرجع مقایسه و ضریب همبستگی بین نتایج به دست آمده از دو کیت، بر اساس روش پیرسون، 0.998 محاسبه گردید. معیار پذیرش برای این آزمایش به صورت زیر تعریف شده است:

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

(Interference) بررسی تداخلات

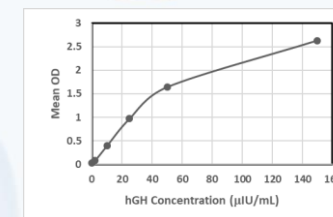
بر اساس فرمول زیر درصد تداخلات رایج در سنجش hGH مورد ارزیابی قرار گرفت:

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

بر اساس نتایج بدست آمده هموگلوبین و تری گلیسرید تا 500 و بیلی روبین تا 30 میلی گرم بر دسی لیتر تأثیری بر نتیجه سنجش ندارند؛ ولی به طور عمومی توصیه بر این است که از نمونه های لیز شده و لیپمیک استفاده نشود.

(Cross Reactivity) بررسی ویژگی - آزمون واکنش متقاطع

واکنش متقاطع ترکیبات مشابه با hGH توسط اضافه کردن غلظت های مختلفی از این ترکیبات به سرم و اندازه گیری نسبت بین مقدار ماده مداخله گر به مقدار hGH مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، سنجش شد. نتایج این بررسی نشان می دهد که این ترکیبات با آنتی بادی 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 بی معنا می باشد. 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 تعیین گردد.

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

پارامترهای کنترل کیفی
(Within Run) بررسی دقت - آزمون دقت درون دور

دقت درون دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت های متفاوت در یک نوبت کاری (20 بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $\text{CV} < 10\%$ است.

Sample	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

(Between Run) بررسی دقت - آزمون دقت بین دور

دقت بین دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت های متفاوت در 4 نوبت کاری (5 بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش $\text{CV} < 10\%$ است.

Sample	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