

کیت اندازه‌گیری هورمون hGH در سرم انسان
hGH ELISA Kit 96t
 Cat. No: 5624-96/Rev: C3 (1403/07/22)

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، ۱.۰، ۲.۵، ۵.۰ و ۱۵۰ µIU/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 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 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 بیمار، 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: قبل از شروع استفاده از کیت، کل حجم محلول رنگزا B (ویال روشن) را داخل محلول رنگزا A (ویال تیره) خالی نمایید و برای انجام تست تا پایان مصرف کیت استفاده نمایید. 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.

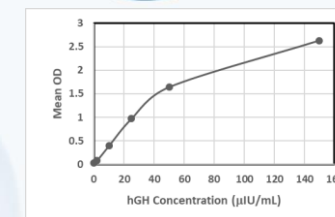
- ۸) شستشوی چاهک‌ها را مطابق با بند ۵ تکرار نمایید.
- ۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری نمایید.

- توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.
- ۱۰) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به تمام چاهک‌ها 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 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. (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 | | |

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



مقادیر مورد انتظار برای تست الیزای hGH

به دلیل ترشح ضربانی و عدم یکنواختی ترشح هورمون رشد، تعیین محدوده مرجع برای مقادیر پایه آن بی معنا 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 تعیین گردد.

| | |
|------------------------|---------------|
| جمعیت بالغین نرمال | 0-55 (µIU/mL) |
| 1 µIU/mL = 0.333 ng/mL | |

پارامترهای کنترل کیفی

۱) بررسی دقت - آزمون دقت درون دور (Within Run)

دقت درون دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

| Sample | 1 | 2 | 3 |
|----------------|------|------|------|
| No. of Repeats | 20 | 20 | 20 |
| Mean (µIU/mL) | 13.6 | 34.3 | 99.4 |
| SD (µIU/mL) | 0.8 | 1.8 | 4.5 |
| CV (%) | 5.9 | 5.2 | 4.5 |

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

دقت بین دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

| Sample | 1 | 2 | 3 |
|----------------|------|------|-------|
| No. of Repeats | 20 | 20 | 20 |
| Mean (µIU/mL) | 14.9 | 27.1 | 121.9 |
| SD (µIU/mL) | 0.9 | 1.5 | 5.9 |
| CV (%) | 6 | 5.5 | 4.8 |

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، $Bias < 10\%$ نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

| No. | Sample (µIU/mL) | Added (µIU/mL) | Exp. (µIU/mL) | Obs. (µIU/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 hGH در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 10\%$ است.

| No. | Sample (µIU/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 |

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 ندارند. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده $10 \pm 1\%$ 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 |

۸) 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 $0.13 \mu\text{IU/mL}$ تعیین گردید.

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

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

(s: Diluted sample & b: Blank)

۹) بررسی پایداری (Stability)






Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت 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.

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر به مدت ۱۸ ماه پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

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.

توجه: چنانچه از دستگاه‌های ایزا پروسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.