کیت ایمونو آنزیماتیک (EIA) پادتن علم (۹۶تستی)

GH

موارد استفاده :

تعیین کمّی GH در سرم یا پلاسما

I. مقدمه :

هورمون رشد (GH) دارای یک زنجیره پلی پپتیدی متشکل از ۱۹۱ اسید امینه می باشد . از بین این اسید آمینه ها ۴ سیستین، دو پیوند دی سولفیدی ایجاد می کنند. این هورمون با وزن مولکولی kDa۲۲ از لحاظ ساختمانی و عملکرد زیستی شبیه پرولاکتین و هورمون عامل لاکتوژن جفت انسان (hPL) است [۱]. هورمون رشد بطور متناوب (پالس) از لوب قدامی غده هیپوفیز ترشح می شود. در فواصل دو پالس مقدار این هورمون ناچیز بوده و بیشترین غلظت سرمی آن در فاز عمیق خواب مشاهده می شود. ترشح هورمون رشد توسط یک مکانیسم تنظیم کننده دو گانه هیپوتالاموس کنترل می شود. بدین صورت که هورمون آزاد کننده GH سبب تحریک آن و هورمون مهار کننده سوماتواستاتین موجب توقف ترشح آن می گردد [۲]. این دو هورمون تنظیم کننده به نوبه خود توسط مراکز فوقانی مغز کنترل می شوند . علاوه بر تحریکات فیزیولوژیک ، محرک هایی نظیر ورزش ، فشار روحی و جسمی ، روزه داری ، پائین بودن سطح قند خون (هیپوگلیسمی) و نیز افزایش برخی از ترکیبات مانند امینو اسیدها ، گلوکاگن و ال-دوپا (L-Dopa) باعث افزایش ترشح این هورمون می گردند. همچنین هورمون هائی نظیر تستوسترون، استروژن و تیروکسین نیز سبب تحریک ترشح این هورمون می شوند [۳-۴]. از طرف دیگر ترکیباتی مانند قند، کورتیزول، اسیدهای چرب و بروموکریپتین ترشح این هورمون را کاهش می دهند [۵]. در دوران رشد ، GH سبب افزایش انتقال اسیدهای امینه از طریق غشاء سلول ها و متعاقباً بالا رفتن سنتز پروتئین می گردد. بدین ترتیب رشد استخوان ها ، بافت های نرم و غضروف ها تحریک و تسریع می گردند. افزایش رشد این بافت ها با تغییراتی در متابولیسم الکترولیت ها همراه می باشد. از جمله این تغییرات می توان بالانس مثبت نیتروژن و فسفر ، افزایش سطح فسفر در پلاسما، کاهش نیتروژن ، اوره و اسیدهای آمینه در خون را نام برد. علاوه بر آن در نتیجه برداشت یون های سدیم ، پتاسیم و کلسیم توسط بافت های رشد یافته ، میزان دفع سدیم و پتاسیم توسط کلیه ها کاهش یافته و جذب آن ها توسط روده ها افزایش می یابد . افزایش ترشح این هورمون در دوران بلوغ سبب بروز ژیگانتیسم و در بزرگسالی باعث آکرومگالی می شود. از طرف دیگر کم کاری غده هیپوفیز و کاهش فعالیت هیپوتالاموس از عوامل فیزیولوژیک کاهش دهنده ترسح هورمون رشد محسوب می شوند . بنابر این با توجه به تناوبی بودن ترشح GH، برای تشخیص آکرومگالی ، ژیگانتیسم و نقصان فعالیت غده هیپوفیز ، تعیین قابلیت تحریک ترشح این هورمون حائز اهمیت می باشد . برای بررسی کمبود ترشح هورمون رشد می توان از محرک هائی مانند انسولین، ال- دوپا (L-Dopa)، ال- آرژنین (L-Argenin)، گلوکاگن و فعالیت های شدید بدنی (۲۰ دقیقه ورزش شدید) استفاده کرد [۶-۹]. همچنین برای بررسی امکان ترشح بیش از حد این هورمون می توان از تحریک گلوکزی و یا تست بازدارنده دوپامین استفاده نمود [۱۰-۱۱].

II. اصول اندازه گیری :

کیت اندازه گیری کمّی GH بر مبنای سنجش واکنش ایمونوآنزیماتیک بر روی فاز جامد طراحی شده است. در این سیستم از دو آنتی بادی مونوکلنال موش که شاخص های آنتی ژنیک متمایزی را بر روی مولکول GH شناسائی می کنند، استفاده شده است. ابتدا به حفره‌های پلی استایرن پوشیده شده با آنتی بادی‌های مونوکلنال GH، استانداردها، سرم کنترل‌ها و نمونه‌های بیماران افزوده می‌شود. در حین انکوباسیون اول، GH موجود در نمونه‌ها به آنتی‌بادی‌های ضد GH متصل شده و سپس بقیه مواد از طریق تخلیه و شستشو از سیستم خارج می‌شوند. پس از شستشو، آنتی‌بادی دوم ضد GH که به آنزیم پراکسیداز (HRP) متصل شده است به حفره‌ها افزوده می‌شود. بعد از دومین انکوباسیون و شستشو، افزودن سوبسترای TMB (۳'و۳-۵'و۵ تترامیل بنزیدین) سبب ایجاد رنگ آبی توسط آنزیم می شود. شدت رنگ ایجاد شده با میزان GH موجود در نمونه‌ها نسبت مستقیم دارد. رنگ‌زائی واکنش آنزیماتیک توسط محلول متوقف کننده خاتمه می یابد و رنگ آبی ایجاد شده به رنگ زرد مبدل می‌شود. شدت رنگ به وسیله یک اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. برای تعیین غلظت GH نمونه‌ها ابتدا منحنی جذب نور استانداردها برحسب غلظت GH آنها رسم شده و سپس میزان غلظت GH نمونه ها از روی منحنی استاندارد تعیین می‌گردد.

III. محتویات کیت:

محلولهای این کیت (Cat.No.P-GHI) جهت انجام ۹۶ تست بوده و تاریخ انقضای هر یک بر روی شیشه آن درج شده است . دمای مناسب برای نگهداری کیت ۸-۲ درجه سانتی گراد می باشد .

۱. **پلیت:** پلیت ۹۶ حفره ای پوشش داده شده با آنتی بادی های منو کلنال ضد GH موش.

۲. **استاندارد صفر :** ۱ ویال ۴ میلی لیتری. از استاندارد صفر برای رقیق کردن نمونه ها نیز استفاده شود .

۳. **استانداردها :** ۵ ویال ۱ میلی لیتری محلول سرم دار حاوی GH انسان. غلظت های دقیق GH استانداردها که توسط استاندارد بین‌المللی سازمان بهداشت جهانی (98/574 IRP)(کالیبر شده اند بر روی برچسب آنها درج شده است.

۴. **کنترل های سرمی :** ۲ ویال ۱ میلی لیتری سرم انسانی حاوی تیمروزال. غلظت دقیق GH کنترل ها بر روی برچسب کنترل ها درج شده است .

۵. **ردیاب آنزیمی :** یک ویال ۶ میلی لیتری آنتی بادی منوکلنال ضد GH متصل به پراکسیداز (HRP) محلول در بافر PBS، حاوی پروتئین و تیمروزال.

۶. **بافر رقیق کننده :** یک ویال ۲۵ میلی لیتری محلول PBS، پروتئین و تیمروزال.

۷. **محلول شستشوی غلیظ (x۲۰):** یک ویال ۲۵ میلی لیتری حاوی PBS-Tween20 و تیمروزال.

۸. **محلول رنگ زا :** یک ویال ۱۲ میلی لیتری بافر حاوی H_2O_2 و TMB.

۹. **محلول متوقف کننده واکنش :** یک ویال ۱۲ میلی لیتری H_2SO_4 **دو نرمال.**

IV. وسایل مورد نیاز (این وسایل همراه کیت عرضه نمی شوند):

۱. دستگاه اسپکتروفتومتر میکروپلیت با دامنه جذب نوری ۳-۰ در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر .

۲. میکروپیپت قابل تنظیم بر روی ۲۵ الی ۲۰۰ میکرولیتر و تیپ های یک بار مصرف.

۳. آب مقطر یا آب دیونیزه برای رقیق کردن محلول شستشو .

V. نحوه جمع آوری و آماده سازی نمونه ها:

نمونه مناسب جهت اندازه گیری GH، سرم یا پلاسمای هپارینه بیمار می باشد . این نمونه ها به مدت یک تا دو روز در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری است . برای نگهداری نمونه ها به مدت طولانی تر ، سرم یا پلاسمای بیمار را در حجم های کم تقسیم نموده ، در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری نمائید . بهتر است از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه ها اجتناب نمود . برای اندازه گیری GH نمونه های منجمد شده ، ابتدا نمونه را در حرارت اتاق ذوب نموده ، سپس با حرکت دست یکنواخت نمائید . برای یکنواخت کردن نمونه ها از Vortex نباید استفاده نمود. برای اندازه گیری دقیق نمونه هائی که میزان GH آنها بیش از آخرین استاندارد است ، ابتدا نمونه ها را با استاندارد صفر رقیق کرده ، سپس اندازه گیری مجدد بعمل آورید . بدیهی است در محاسبه نتایج این نمونه ها ، ضریب رقت منظور می شود .

VI. روش کار :

قبل از شروع کار دمای تمامی محلولها باید به دمای اتاق برسد.

محلول شستشوی غلیظ به نسبت یک به بیست با آب مقطر یا دیونیزه رقیق شود. (یک حجم محلول شستشوی غلیظ به ازاء ۱۹ حجم آب) محلول شستشوی رقیق را تا یک هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد می‌توان نگهداری کرد.در صورت مشاهده کریستال در محلول غلیظ شستشو ، ویال را به مدت چند دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید تا محلول یکنواخت گردد.

۱. ابتدا ۲۵ میکرولیتر از استانداردها، سرم کنترل ها و سرم بیماران را داخل حفره ها ریخته و به آن ۲۰۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده اضافه کنید ، سپس با تکان دادن پلیت ، محتویات حفره ها را به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط نمائید .

۲. پلیت را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید .

۳. حفره ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرو لیتر محلول شستشو بشوئید .

۴. به هر حفره ۵۰ میکرولیتر از کونژوگه ضد GH (HRP) افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت اتاق قرار دهید.

۵. حفره ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشوئید.

۶. به هر حفره ۱۰۰ میکرو لیتر از سوبسترای TMB اضافه نمائید.

۷. پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در محلی تاریک قرار دهید.

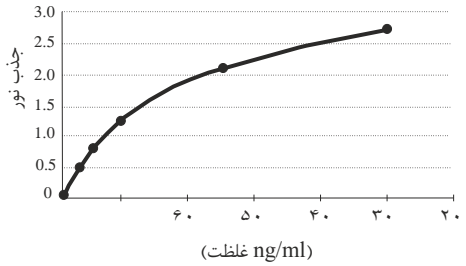
۸. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش را در هر حفره ریخته و به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط کنید . میزان جذب نور حفره ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده ، بخوانید.

VII. محاسبه نتایج :

پس از تعیین میزان جذب نوری استانداردها و نمونه ها و ترسیم منحنی استاندارد ، غلظت GH بیماران قابل محاسبه است . در منحنی مذکور که با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (قابل برنامه ریزی) و یا به صورت دستی ترسیم می شود، محور Y شاخص میزان جذب نور استانداردهای GH در طول موج ۴۵۰ نانومتر و محور X شاخص غلظت استانداردهای GH برحسب ml/ng می باشد . نتایجی که در جدول زیر آمده ، فقط به عنوان مثال بوده و نبایستی بعنوان نتایج حاصل از آزمایش تلقی شود.

غلظت GH (ng/ml)	جذب نور	نمونه
۰	۰/۰۲	استاندارد A
۲/۵	۰/۵۰	استاندارد B
۵	۰/۸۱	استاندارد C
۱۰	۱/۲۷	استاندارد D
۲۵	۲/۱۰	استاندارد E
۵۰	۲/۷۳	استاندارد F
۲۴	۲/۰۷	سرم

برای ترسیم منحنی از غلظت های مندرج بر روی ویال استانداردها استفاده نمائید.



VIII. مقادیر طبیعی:

تعیین غلظت پایه ای GH در سرم افراد سالم به علت تغیّر آن ، در شرایط متفاوت و ساعت های مختل روز امکان پذیر نمی باشد. با این وصف در کتب رفرانس برای افراد سالم ، غالباً غلظت سرمی GH طبق جدول زیر گزارش شده است.

غلظت GH (ng/ml)	سن
۰-۱۰	کودکان
۰-۴	مردان بالغ
۰-۱۸	زنان بالغ

IX. ویژگی های اختصاصی تست:

۱. حساسیت : به حداقل غلظت GH که اختلاف جذب نور آن نسبت به جذب نور استاندارد صفر ، معنی دار باشد حساسیت کیت گفته می شود. این مقدار برای کیت ۰/۱ ng/ml، GH است.

۲. اثر Hook : در کیت EIA پادتن علم برای نمونه های رقیق نشده تا غلظت ۲۰۰۰ ng/ml اثر Hook مشاهده نشده است.

۳. مقایسه با کیت رادیو ایمونوتک GH (EIA) : برای بررسی همبستگی آماری بین کیت EIA پادتن علم و کیت RIA ایمونوتک فرانسه ، غلظت ۵۰۰ GH، نمونه تصادفی با هر دو کیت اندازه گیری شد. مقایسه نتایج به دست آمده ، ضریب همبستگی ۰/۹۸ را نشان می دهد.

۴. دقت : شاخص دقت کیت با مقایسه تکرارپذیری جواب ها به روش میان‌سنجی (Inter-assay) و درون‌سنجی (Intra-assay) تعیین گردیده است. برای این منظور ۴ نمونه سرم ده بار در یک دوره آزمایش (درون‌سنجی) و یکبار در ده دوره آزمایش متفاوت (میان‌سنجی) تعیین غلظت شده است. نتایج انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات (CV) در جدول زیر آمده است :

جدول شاخص دقت

درون سنجی			میان سنجی		
%CV	SD	میانگین (ng/ml)	%CV	SD	میانگین (ng/ml)
۵/۳	۰/۱۷	۳/۲	۶/۷	۱/۸	۲/۷
۳/۴	۰/۲۲	۶/۵	۳/۹	۰/۳۲	۸/۲
۳/۳	۰/۴۶	۱۴/۲	۵/۳	۰/۷۸	۱۴/۶
۵/۲	۲/۰۰	۳۸/۱	۵/۴	۱/۸۴	۳۳/۶

۵. ریکاوری و رقت : ریکاوری به حالتی اطلاق می‌شود که با افزودن حجم معینی از یک محلول با غلظت بالا، به نمونه رقیق‌تر، افزایش غلظت حاصل شود. برای تعیین ریکاوری، محلولی با غلظت بالای GH به نمونه سرمی که غلظت پائینی از GH دارد، افزوده شده است. درصد ریکاوری طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود :

$$\frac{\text{غلظت اندازه گیری شده (ng/ml)}}{\text{غلظت پیش بینی شده (ng/ml)}} \times ۱۰۰$$

دامنه درصد ریکاوری بدست آمده مابین ۹۰ تا ۱۰۶/۷ می‌باشد.

جدول ریکاوری

ریکاوری ٪	غلظت اندازه گیری شده (ng/ml)	غلظت پیش بینی شده (ng/ml)	غلظت افزوده شده (ng/ml)
-	۱/۶	-	-
۹۶/۰	۴/۹	۵/۱	۰/۴
۹۰/۰	۷/۲	۸/۰	۰/۸
۱۰۱/۵	۱۲/۸	۱۲/۶	۱/۶
۱۰۶/۷	۲۲/۲	۲۰/۸	۴/۰

برای بررسی خطی بودن رقتهای GH بر روی منحنی چندین نمونه سرمی غلیظ، پس از رقیق شدن متوالی با استاندارد صفر، اندازه‌گیری شده و نتایج یک نمونه بعنوان مثال در جدول زیر آورده شده است. دامنه درصد ریکاوری بدست آمده مابین ۹۶ تا ۱۰۴ می‌باشد.

جدول رقت

ریکاوری ٪	غلظت اندازه گیری شده (ng/ml)	غلظت پیش بینی شده (ng/ml)	رقت
-	۴۰/۰	-	-
۱۰۲/۵	۲۰/۵	۲۰/۰	۱:۲
۱۰۴/۰	۱۰/۴	۱۰/۰	۱:۴
۱۰۴/۰	۵/۲	۵/۰	۱:۸
۹۶/۰	۲/۴	۲/۵	۱:۱۶

X.References

1.BurtisC. A.,Ashwood E. R., Fundamentals of clinical chemistry. 11th Edition: 789, 1999.

2.Martin, J. B. Neural Regulation of Growth Hormone Secretion. NEJM. 283:1364, 1973.

۳.Brown, G. M. and Kirpalani, S. H. A Critical Review of the Clinical Relevance of Growth Hormone and its Measurement in the Nuclear Medicine Laboratory. Semin. Nucl.Med. 5:273,1975.

۴.Merimee, T. J. and Rabin, B. Progress in Endocrinology and Metabolism: A Survey of Growth Hormone Secretion and Action. Metabolism 22:1235,1973.

۵.Roth, J., Glick, S. M" Yalow, R. S. and Berson, S. A. Hypoglycemia: A Potent Stimulus to Secretion of Growth Hormone. Science 140:987,1963.

۶.Fraiser, S. B. A Review of Growth Hormone Stimulation Tests in Children. Pediatrics 53:929,1974.

۷.Sutton, J. and Lazarus, L. Growth Hormone in Exercise: Comparison of Physiological and Pharmacological Stimuli. J. App. Physiol. 41:523,1976.

۸.Mitchell, M. L, Byrne, M. J., Sanchez, Y" Sawin, C. T. Betection of Growth Hormone Beficiency. NEJM. 282:539,1970.

۹.Martin, J. B., Rabinowitz, B., Riggs, L., Burgess, J.A., Rimoin, B. L. and McKusick, V. A. Plasma Growth Hormone After Arginine Infusion. NEJM. 278:434,1967.

۱0.Beck, P., Schalch, B.S., Parker, M.L., Kipnis, D. M. and Daughaday, W. H. Correlative Studies of Growth Hormone and Insulin Plasma Concentrations with Metabolic Abnormalities in Acromegaly. J. Lab. Clin. Med. 66:366,1965.

۱1.Eddy, R.L, Gilliland, P. F" Ibarra, J. B. McMurry, J. F" Thompson, J. Q. Human Growth Hormone Release: Comparison of Provocative Tests Procedures. Am. J. Med. 56:179,1974..

احتیاط!

با توجه به اینکه محلول‌های به‌کار رفته در این کیت‌ها حاوی مواد سمی مانند تیمروزال و مواد پروتئینی با منشا انسانی و حیوانی هستند، و اینکه با هیچ تستی نمی توان از عدم وجود ویروس‌هایی چون HCV ، HBV،HIV در این محلول‌ها اطمینان کامل حاصل کرد، خواهشمند است هنگام کار احتیاط‌های لازم از جمله استفاده از دستکش، امتناع از خوردن و آشامیدن و سیگار کشیدن، خودداری از پیپت کردن با دهان و پرهیز از هرگونه تماس محلول با چشم و دست‌ها، رعایت شود.

Rev: Jul 2020

تهران ۱۴۱۶۸، خیابان طالقانی غربی، خیابان سرپرست(کیوان جنوبی)، پلاک ۲۶
تلفن و فکس : ۶۳۴۸۱(۰۲۱)