

کیت سنجش hCG.Rapid به روش الایزا

مقدمه :

hCG هورمون گلیکوپروتئینی است که بصورت طبیعی در دوران بارداری توسط جفت ترشح می شود. با شروع بارداری غلظت آن در خون به سرعت افزایش یافته و در اواخر سه ماهه اول به بالاترین میزان خود می رسد. در خلال بارداری مقدار این هورمون در خون بسیار بالا بوده ولی به محض زایمان و بعد از گذشت چند روز مقدار آن به شدت کاهش یافته و قابل اندازه گیری نمی باشد. از نظر ساختمانی مولکول کامل hCG دارای دو زیرواحد آلفا و بتا می باشد ، زنجیره آلفا ساختمان مشابهی با زنجیره آلفای سایر هورمونهای گلیکوپروتئینی مانند LH, FSH و TSH دارد. تفاوتیهای موجود در زیر واحد بتاست که تفاوتیهای بیولوژیکی و نیز ایمنونوشیمیایی این هورمونها را سبب می گردد که این تفاوتیهای ایمنونوشیمیایی در تشخیص و اندازه گیری این هورمونها حائز اهمیت فراوان هستند . برخی آنتی بادی ها توانائی شناسایی سایتیهای خاصی از زنجیره بتا را در مولکول hCG دارند که این سایتیها در سایر هورمونهای گلیکو پروتئینی وجود ندارند. بنابراین با استفاده از این آنتی بادی ها میتوان سنجش این هورمون را بطور اختصاصی انجام داد. روشیهای اختصاصی سنجش این هورمون امکان تشخیص بارداری را ۸ تا ۱۱ روز پس از لقاح فراهم می سازد. کیت حاضر قابلیت اندازه گیری و تیتراسیون هورمون hCG را با اختصاصیت و حساسیت بسیار بالا دارا می باشد .

اساس آزمایش :

اساس این کیت به روش ساندویچ و با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادیهای علیه یک شاخص آنتی ژنیک مولکول hCG پوشش داده می شوند (Coating). نمونه بیماران با آنتی بادی پوشش داده شده در ته چاهکها مجاور می شود، پس از انکوباسیون و شستشو ، آنتی بادی ثانویه ضد hCG متصل به آنزیم HRP به چاهکها اضافه می شود. مقدار کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها با غلظت hCG در نمونه ها متناسب است. پس از شستشوی مرحله دوم محلول رنگزا که محتوی هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و کروموژن است، داخل چاهکها ریخته می شود که رنگ آبی پدید آمده متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها می باشد. با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد .

محتویات کیت :

- ۱) یک پلیت ۹۶ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد hCG (Anti-hCG Coated Plate) .
- ۲) محلول آنزیم کنژوگه (hCG Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۶ میلی لیتر (آماده مصرف) .
- ۴) سری استانداردها (Standards Set) : شامل ۶ ویال استاندارد با غلظتهای صفر ، ۲۵ ، ۱۰۰ ، ۲۵۰ ، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ IU/L از hCG کالیبره شده بر مبنای WHO IS 75/537^{3rd} (استاندارد صفر حاوی ۱۵ میلی لیتر و سایر استانداردها حاوی ۱ میلی لیتر می باشند) .
- ۵) سرم کنترل (Control Serum) : یک ویال حاوی ۱ میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال .
- ۶) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف) .
- ۷) محلول شستشو (Wash Solution) : یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۲۰X) . جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف ، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید .
- ۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر اسید کلریدریک ۱ نرمال .
- ۹) برچسب مخصوص پلیت .

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند :

- ۱) دستگاه الایزایدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر فرانس) .
- ۲) سمپلر های ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر دقیق .
- ۳) آب مقطر .

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

- ۱) محتویات این کیت برای مصرف در همین کیت طراحی شده اند .
- ۲) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختههای مختلف جداً خودداری نمایید .

۳) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg و آنتی بادی های ضد HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند ، به منظور احتیاط توصیه می شود تا کاربرانی که با این کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند .

شرایط نگهداری :

- ۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید .
- ۲) چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید .
- ۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای یاد شده بر روی هر یک از آنها می باشد .
- ۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۸- ۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد .

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم یا پلاسما را می توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود ، نمونه را میتوان به مدت دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و یا برای مدت طولانی تر (حداکثر تا ۳۰ روز) در دمای ۲۰- ۰ درجه سانتی گراد نگهداری کرد. از ذوب و فریز نمودن مکرر نمونه پرهیز شود .

توضیحات عمومی :

- ۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به دمای اتاق برسانید .
- ۲) بهتر است به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند .
- ۳) از نوک سمپلرهای یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید .
- ۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده، جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .
- ۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند .
- ۶) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب، زمان انکوباسیون مناسب میباشد، بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب محلولهای مورد نیاز را باز کنید، این امر با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیقتر می شود .
- ۷) به دلیل سرعت بالای واکنشها در این کیت و زمان انکوباسیون کوتاه، توصیه میشود که در هر بار انجام آزمایش بیش از ۲ استریپ نمونه را به کار نبرید .

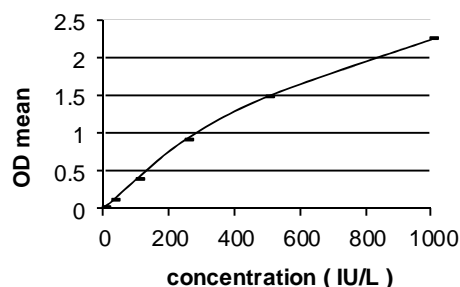
مراحل انجام آزمایش :

- ۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب نموده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .
- ۲) ۵۰ میکرولیتر از هر استاندارد، سرم کنترل و نمونه را داخل هر چاهک بریزید، پیشنهاد می گردد که از استانداردها و نمونه ها بصورت داپلیکیت استفاده شود بدین معنی که هر استاندارد و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید .
- ۳) درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت ۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۸- ۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید .
- ۴) چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (برای شستشو می توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد، در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو چاهکها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند) .
- ۵) ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) را به هر چاهک اضافه نمایید .
- ۶) درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت ۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۸- ۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید .
- ۷) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار بشویید (همانند بند۴) .
- ۸) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) به هر چاهک اضافه نمایید .
- ۹) چاهکها را به مدت ۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید .
- ۱۰) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزایدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نمایید (توصیه میشود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد) .

محاسبه نتایج :

از هر دستگاه ایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm میتوان استفاده نمود .
 ۱) جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه ایزاریدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر فرانس ۶۳۰ nm) بخوانید .
 ۲) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آنها نموداری (Point to point) رسم کنید به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آنها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد بدست آورید، سپس نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید و منحنی را ترسیم نمایید .
 ۳) میانگین جذب نوری هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی محل آن را پیدا کنید، نقطه مذکور را توسط یک خط افقی به منحنی وصل نمایید بطوریکه این خط بر محور Y کاملاً عمود باشد و سپس از محل تلاقی خط و منحنی خطی عمود بر محور افقی رسم کنید نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد .

استانداردها (IU/L)	جذب نوری
۰	۰/۰۲۱
۲۵	۰/۱۰۱
۱۰۰	۰/۳۹۵
۲۵۰	۰/۹۲۱
۵۰۰	۱/۴۹۵
۱۰۰۰	۲/۲۵۵



توجه : جذبهای نوری و منحنی مربوطه فقط به عنوان نمونه می باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید .

مقادیر مورد انتظار :

مقادیر تخمینی hCG در سرم فرد طبیعی در طول مدت بارداری از قرار زیر می باشد :

موجود در سرم (IU/L) مقدار hCG	زمان پس از بارداری
۰ - ۵۶۵۰۰	ماه اول
۷۶۵۰ - ۲۸۸۵۰۰	بین ماه دوم تا سوم
۳۶۰۰ - ۱۰۶۰۰۰	سه ماهه دوم
۴۲۰۰ - ۱۱۷۰۰۰	سه ماه سوم

به صورت تخمینی در خلال شش هفته اول بارداری غلظت سرمی hCG هر دو روز دو برابر می شود، بعد از وضع حمل مقدار hCG بسرعت پایین آمده و بعد از مدت کوتاهی به پایین ترین حد خود می رسد. مقدار خیلی کمی از hCG در موارد حاملگی های خارج رحمی مشاهده می شود. در صورتی که در شرایطی نظیر تنوپلاسم تروفوبلاستیک و یا غیر تروفوبلاستیک و مول هیداتی فرم می توان غلظتهای بسیار بالای hCG را مشاهده نمود .

توجه : جهت تشخیص بارداری، سرمهایی که دارای غلظت hCG ۲۵ - ۱۰ IU/L می باشند باید مشکوک قلمداد شده و سرمهایی که غلظت hCG در آنها بیش از ۲۵ IU/L باشد مثبت تلقی می شوند، در مورد سرمهای مشکوک و منفی به منظور حصول اطمینان باید حداقل ۴۸ ساعت بعد نمونه گیری مجدد صورت گرفته و آزمایش تکرار شود. در صورتیکه غلظت hCG در نمونه بیش از ۱۰۰۰ IU/L باشد جهت بدست آوردن غلظت صحیح می توان سرم را با استاندارد صفر رقیق نموده و پس از بدست آوردن غلظت نمونه رقیق شده ، عدد حاصل را در ضریب رقت ضرب نمود .

نکته : هر چند طراحی این کیت به گونه ای است که از تاثیر عوامل مداخله گر تا حد امکان جلوگیری شود اما به ندرت امکان دارد بعضی عوامل موجود در نمونه سرم از جمله آنتی بادی های هتروفیلیک برخی داروها اتوانتی بادی ها و نظایر اینها بر نتیجه آزمایش اثر بگذارند . بنابر این بهتر است تفسیر نتیجه آزمایش با در نظر گرفتن نتایج معاینات بالینی یافته های تشخیصی دیگر و شرح حال بیمار انجام گیرد .

شاخصهای اجرایی :

(۱) حداقل مقدار قابل اندازه گیری :

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار (SD)، حداقل غلظت hCG قابل تشخیص در این کیت ۱ IU/L می باشد .

(۲) دقت آزمایش :

آزمایشهای اینترا-اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و اینترا-اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایشات مختلف) با استفاده از ۳ سرم با غلظتهای مختلف hCG انجام گردید که در جداول ۱ و ۲ آمده است :

جدول شماره ۱ (اینترا-اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (IU/L)	SD	CV%
۱	۲۴	۱۴/۵	۰/۸	۵/۵
۲	۲۴	۲۲۸	۸/۲	۳/۶
۳	۲۴	۸۹۰	۴۵	۵

جدول شماره ۲ (اینترا-اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (IU/L)	SD	CV%
۱	۱۰	۱۵/۹	۱/۱۲	۷
۲	۱۰	۳۳۱	۱۰/۵	۴/۵
۳	۱۰	۹۰۶	۵۶/۸	۶/۳

هر سری آزمایش بصورت Duplicate انجام شده است .

(۳) ریکاوری آزمایش :

مقادیر معلومی از hCG به ۴ سرم با غلظتهای مشخص hCG افزوده شد و ریکاوری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول زیر آمده است :

نمونه	مقدار hCG موجود در سرم (IU/L)	مقدار افزوده شده hCG (IU/L)	مقدار مورد انتظار (IU/L)	مقدار بدست آمده (IU/L)	ریکاوری (%)
۱	۲۵	۲۵	۲۵	۲۴	۹۶
۱	۲۵	۲۵۰	۱۳۷/۵	۱۴۴	۱۰۵
۱	۲۵	۱۰۰۰	۵۱۲/۵	۵۰۱	۹۸
۲	۱۳۱	۲۵	۷۸	۷۳	۹۳
۲	۱۳۱	۲۵۰	۱۹۰/۵	۲۰۲	۱۰۶
۲	۱۳۱	۱۰۰۰	۵۶۵/۵	۵۵۵	۹۸
۳	۳۶۵	۲۵	۱۹۵	۲۰۲	۱۰۳
۳	۳۶۵	۲۵۰	۳۰۷/۵	۳۱۵	۱۰۲
۳	۳۶۵	۱۰۰۰	۶۸۲/۵	۶۹۰	۱۰۱
۴	۸۴۰	۲۵	۴۳۲/۵	۴۲۵	۹۸
۴	۸۴۰	۲۵۰	۵۴۵	۵۶۵	۱۰۴
۴	۸۴۰	۱۰۰۰	۹۲۰	۹۰۰	۹۸

(خطی بودن آزمایش :

به کمک استاندارد صفر رقتهای متوالی ۴ نمونه سرم با غلظت مشخص از hCG تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت محاسبه شد که در جدول زیر نتایج آن آورده شده است :

ریکاوری (%)				مقدار hCG موجود در سرم رقتی نشده (IU/L)	نمونه
رقت ۱/۱۶	رقت ۱/۸	رقت ۱/۴	رقت ۱/۲		
۹۶	۱۰۰	۱۰۵	۹۴	۴۳۵	۱
۹۹	۹۷	۱۰۲	۹۵	۸۱۴	۲
۹۹	۹۳	۱۰۰	۹۸	۱۳۷۰	۳
۹۸	۹۶	۹۸	۱۰۱	۱۸۹۰	۴

(اختصاصیت آزمایش :

اختصاصیت این آزمایش به کمک سرمهایی با غلظتهای مختلف hTSH , hFSH و hLH جهت بررسی واکنشهای متقاطع با hCG بررسی شد که نتایج آن در جدول زیر آمده است :

جدول اختصاصیت (واکنش متقاطع) :

غلظت ظاهری hCG (IU/L)	غلظت	آنالیت
< ۱	۱۰۰۰	hFSH (IU/L)
	۵۰۰	
	۲۰۰	
	۱۰۰	
< ۱	۱۰۰۰	hTSH (mIU/L)
	۵۰۰	
	۲۰۰	
	۱۰۰	
< ۱	۱۰۰۰	hLH (IU/L)
	۵۰۰	
	۲۰۰	
	۱۰۰	

(اثر هوک (Hook Effect) :

آزمایش hCG جهت سرمهایی با غلظت بسیار بالا از این آنالیت (تا ۵۰۰/۰۰۰ IU/L) صورت گرفت که پدیده هوک مشاهده نشد .

References:

- Bagshave K.D.(1984)Clinical applications of hCG.Adv. in Exper. Med. and Biol. 176:313-324.
 Braunstein G.D., Rasor J., Adler D. et al.(1976) Serum human chorionic gonadotropin levels throughout normal pregnancy. Am. J. Obst. Gynec. 126:678.
 Saller B., Clara R., Spottl G. et al. (1990) Testicular cancer secretes intact human choriogonadotropin (hCG) and its free B-subunit: Evidence that hCG (+hCG-B) assays are the most reliable in diagnosis and follow-up. Clin. Chem. 36/2:234-239.
 Bogart M.H., Pandian M.R. and Jones O.W. (1987) Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities. Prenatal Diagnosis 7:623-630.

روش انجام آزمایش hCG Rapid بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی بادی ضد hCG			
محلونها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
استانداردها	۵۰ میکرولیتر	-	-
سرم کنترل	-	۵۰ میکرولیتر	-
نمونه	-	-	۵۰ میکرولیتر
دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بیوشانید. ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید . برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .			
آنزیم کنژوگه	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر
دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بیوشانید. ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید . برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید .			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر فرانس) قرانت کنید .			