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

ßHCG

موارد استفاده :

تعیین کمّی ßHCG در سرم یا پلاسما

I. مقدمه :

هورمون HCG(Human Chronic Gonadotropin)، گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ۳۶/۷ kDa است که از بافت جفت جنین ترشح می‌شود[۱-۲]. این مولکول از دو زنجیرهٔ α و ß ساخته شده است که با پیوندهای غیر کووالانسی به هم متصل شده‌اند. برخلاف زنجیرهٔ ß که مختص HCG بوده و مسئول خصوصیات بیولوژیکی این ملکول می باشد ، زنجیرهٔ α در مولکول‌های FSH,LH و TSH مشترک است[۳-۴]. ترتیب توالی اسیدهای آمینهٔ زنجیرهٔ ßHCG شباهت زیادی به زنجیرهٔ ß هورمون LH دارد[۵].

در افراد سالم غیر حامله، غلظت سرمی HCG معمولاً کمتر از ۵ IU/l است.

در حاملگی، بیماری‌های تروفوبلاستیک و تومورهای ژرمینال، میزان HCG در خون افزایش می‌یابد. در حاملگی‌های طبیعی داخل رحمی، میزان HCG در خون به سرعت بالا می‌رود. ۸ تا ۱۱ روز بعد از لقاح، غلظت هورمون حاملگی به سطح تقریبی ۵IU/l می رسد[۶]، سپس در طول ۶ هفتهٔ اول حاملگی غلظت آن هر ۱/۵ تا ۳ روز دو برابر می‌شود. در حدود هفته‌های ۸-۱۰ حاملگی، غلظت HCG به بالاترین میزان خود که در حدود ۱۰۰,۰۰۰ IU/l است رسیده و از سه ماههٔ دوم حاملگی میزان آن به آرامی در سرم و ادرار کاهش می‌یابد. غلظت HCG در موارد حاملگی دوقلوها تقریباً دو برابر بوده[۷] و در ناهنجاری‌هایی نظیر حاملگی خارج رحمی و سقط‌های خود به خودی به طور غیرعادی پائین می باشد[۸-۱۰].

مهمترین کاربرد اندازه‌گیری میزان HCG تشخیص زودرس حاملگی و پیگیری آن و ناهنجاری‌های وابسته به حاملگی است. علاوه بر آن اندازه‌گیری HCG شاخص خوبی برای تشخیص تومورهای جفت (تروفوبلاستیک) و برخی از تومورهای بیضه است[۱۱-۱۴]. در این بیماری ها میزان HCG نسبت مستقیم با اندازهٔ تومور و پیشرفت بیماری دارد.

II. اصول اندازه گیری :

کیت اندازه‌گیری کمّی ßHCG بر مبنای سنجش واکنش ایمونوآنزیماتیک بر روی فاز جامد طراحی شده است. در این سیستم از دو آنتی بادی مونوکلونال موش که شاخص‌های آنتی ژنیک متمایزی را بر روی مولکول ßHCG شناسائی می کنند، استفاده شده است. ابتدا به حفره‌های پلی استایرن پوشیده شده با آنتی بادی‌های مونوکلونال ßHCG، استانداردها، سرم کنترل‌ها و نمونه‌های بیماران افزوده می‌شود. در حین انکوباسیون اول، ßHCG موجود در نمونه‌ها به آنتی‌بادی‌های ضد ßHCG متصل شده و سپس بقیه مواد از طریق تخلیه و شستشو از سیستم خارج می‌شوند. پس از شستشو، آنتی‌بادی دوم ضد ßHCG که به آنزیم پراکسیداز (HRP) متصل شده است به حفره‌ها افزوده می‌شود.

بعد از دومین انکوباسیون و شستشو، افزودن سوبسترای TMB (۳ و ۳'-۵ و ۵' تترامیل بنزیدین) سبب ایجاد رنگ آبی توسط آنزیم می شود. شدت رنگ ایجاد شده با میزان ßHCG 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 ßHCG نمونه‌ها ابتدا منحنی جذب نور استانداردها برحسب غلظت ßHCG آنها رسم شده و سپس میزان غلظت ßHCG نمونه ها از روی منحنی استاندارد تعیین می‌گردد.

III. محتویات کیت:

محلولهای این کیت جهت انجام ۹۶ تست بوده و تاریخ انقضای هر یک بر روی ویال 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 مونوکلونال ضد ßHCG موش.

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

۳. استانداردها: ۶ ویال ۱/۵ میلی لیتری محلول سرم دار حاوی ßHCG انسانی، PBS، پروتئین و تیمروزال. غلظت‌های دقیق ßHCG استانداردها که توسط استاندارد بین المللی (IRP 1st 75/589) سازمان بهداشت جهانی کالیبر شده اند بر روی برچسب آنها درج شده است.

۴. کنترل های سرمی: ۲ ویال ۱/۵ میلی لیتری سرم حاوی ßHCG انسانی، PBS و تیمروزال. غلظت های دقیق ßHCG کنترل های سرمی بر روی برچسب کنترل ها درج شده است.

۵. ردیاب آنزیمی: یک ویال ۶ میلی لیتری آنتیبادی مونوکلونال ضد ßHCG متصل به پراکسیداز (HRP) محلول در بافر PBS، حاوی پروتئین و تیمروزال.

۶. بافر رقیق کننده: یک ویال ۶ میلی لیتری محلول PBS حاوی پروتئین و تیمروزال.

۷. محلول شستشو غلیظ (20x): یک ویال ۲۵ میلی لیتری حاوی PBS-Tween20 و تیمروزال.

۸. محلول رنگ زا: یک ویال ۱۲ میلی لیتری بافر 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 نمی‌شوند):

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 ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر و تیپ های یک بار مصرف.

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

V. نحوه جمع آوری و آماده‌سازی نمونه ها:

نمونه مناسب جهت اندازه گیری ßHCG، سرم یا پلاسمای هپارینه بیمار می باشد . این نمونه ها به مدت یک هفته 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 ßHCG 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 ßHCG 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 سانتی‌گراد 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 ۱۰۰ میکرولیتر از استانداردها، سرم کنترل ها و سرم بیماران را داخل حفره ها ریخته و به آن ۵۰ 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 مرتبه با ۳۰۰ میکرو لیتر محلول شستشو بشوئید .

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

۵. حفره ها را ۴ مرتبه 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 .

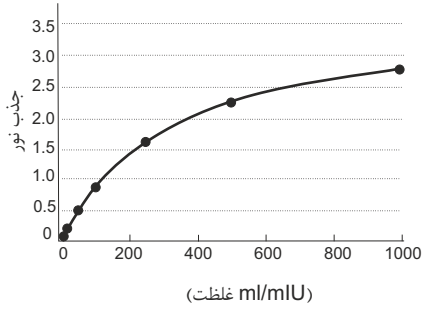
۸. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش را در هر حفره ریخته و به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط کنید . میزان جذب نور حفره ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده ، بخوانید.

VII. محاسبه نتایج :

پس از تعیین میزان جذب نوری استانداردها و نمونه ها و ترسیم منحنی استاندارد ، غلظت ßHCG 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 ßHCG در طول موج ۴۵۰ نانومتر و محور X شاخص غلظت استانداردهای ßHCG برحسب mIU/ml می باشد . نتایجی که در جدول زیر آمده ، فقط به عنوان مثال بوده و نبایستی بعنوان نتایج حاصل از آزمایش تلقی شود.

غلظت ßHCG (mIU/ml)	جذب نور	نمونه
۰	۰/۰۱	استاندارد A
۱۰	۰/۱۴	استاندارد B
۵۰	۰/۴۹	استاندارد C
۱۰۰	۰/۸۲	استاندارد D
۲۵۰	۱/۵۸	استاندارد E
۵۰۰	۲/۲۱	استاندارد F
۱۰۰۰	۲/۷	استاندارد G
۱۹۳/۰	۱/۵۱	سرم

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



VIII. مقادیر طبیعی:

در افراد سالم غیر حامله، غلظت سرمی معمولاً کمتر از ۵ mIU/ml می باشد. جهت تشخیص بارداری ، توصیه می گردد سرم هایی که غلظت ßHCG آنها بین 5 mIU/ml - 20 mIU/ml است، مشکوک تلقی شده و تست به فاصلهٔ ۴۸ ساعت بر روی نمونهٔ جدید تکرار گردد .

در حاملگی ، بیماری های تروفوبلاستیک و تومورهای ژرمینال میزان HCG در خون افزایش می یابد. در حاملگی های طبیعی داخل رحمی ، مقدار HCG گزارش شده برای هفته های متفاوت به شرح زیر می باشد :

بعد از باروری	بعد از LMP	غلظت (mIU/ml)
هفته ۲	هفته ۴	۵-۱۰۰
هفته ۳	هفته ۵	۲۰۰-۳۰۰
هفته ۴	هفته ۶	۱۰۰۰۰-۸۰۰۰۰
هفته ۵-۱۲	هفته ۷-۱۴	۹۰۰۰۰-۵۰۰۰۰۰
هفته ۱۳-۲۴	هفته ۱۵-۲۶	۵۰۰۰-۸۰۰۰۰
هفته ۲۵-۳۸	هفته ۲۷-۴۰	۳۰۰۰-۱۵۰۰۰

جدول بالا به عنوان یک راهنمای کلی ارائه شده است [۱۵]. توصیه می گردد که هر آزمایشگاه با در نظر گرفتن غلظت سرمی ßHCG در هفته های متفاوت بارداری ، دامنهٔ آن را تعیین نموده و از آن به عنوان مبنای مقایسهٔ خود استفاده نماید.

IX. ویژگی های اختصاصی تست:

۱. حساسیت: به حداقل غلظت ßHCG که اختلاف جذب نور آن نسبت به جذب نور استاندارد صفر ، معنی دار باشد حساسیت کیت گفته می شود. این مقدار برای کیت ßHCG، 1mIU/ml است.

۲. اثر هوک (Hook effect): در کیت EIA پادتن علم برای نمونه های رقیق شده تا غلظت 500,000 mIU/ml اثر هوک مشاهده نشده است.

۳. اختصاصی بودن: اختصاصی بودن تست ßHCG با اندازه گیری مقادیر بالایی از هورمون های LH (1000 mIU/ml)، FSH (1000 mIU/ml) و TSH (1000 µIU/ml) مورد بررسی قرار گرفته است . نتایج این آزمایشات تداخلی در جدول زیر نشان داده شده است.

(Cross-Reactivity) ’ óöÉö≠ùô	‹ ·/ù ‰
۰/۱۱	LH
۰/۰۳	FSH
۰/۰۱	TSH

۴. مقایسه با روش الکتروکمی لومینسانس ßHCG: برای بررسی همبستگی آماری بین کیت EIA پادتن علم و کیت Cobas غلظت ßHCG، ۵۰۰ نمونه تصادفی با هر دو کیت اندازه گیری شد. مقایسه نتایج به دست آمده ، ضریب همبستگی ۰/۹۳ را نشان می دهد.

۵. دقت: شاخص دقت کیت با مقایسه تکرارپذیری جواب‌ها 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	ÓÈ"ñÿ	%CV	SD	ÓÈ"ñÿ
۵/۲	۰/۱	۲/۰	۵/۰	۰/۶	۱۲/۴
۴/۹	۰/۷	۱۵/۷	۳/۲	۰/۷	۲۱/۸
۴/۱	۰/۷	۱۹/۰	۷/۸	۴/۷	۶۰/۱
۸/۲	۴/۴	۵۴/۰	۱/۹	۲/۶	۱۳۴/۷

۶. 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 ßHCG به نمونه سرمی که غلظت پائینی از ßHCG دارد، افزوده شده است. درصد ریکاوری طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود :

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

دامنه درصد ریکاوری بدست آمده مابین ۸۵/۶ تا ۹۹ می‌باشد.

جدول ریکاوری

ریکاوری ٪	غلظت اندازه گیری شده (mIU/ml)	غلظت پیش بینی شده (mIU/ml)	غلظت افزوده شده (mIU/ml)
–	۱۰/۷	–	–
۹۶/۰	۱۹/۳	۲۰/۱	۹/۴
۸۵/۶	۳۷/۶	۴۳/۹	۲۴/۶
۸۸/۹	۶۰/۱	۶۷/۶	۳۰/۰
۹۹/۰	۱۰۹/۲	۱۱۰/۳	۵۰/۲

برای بررسی خطی بودن رقتهای ßHCG 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 ۹۵/۴ تا ۱۰۷/۱ می‌باشد.

جدول رقت

ریکاوری ٪	غلظت اندازه گیری شده (mIU/ml)	غلظت پیش بینی شده (mIU/ml)	رقت
–	۱۱۲/۰	–	–
۹۷/۵	۵۴/۶	۵۶/۰	۱:۲
۹۵/۴	۲۶/۷	۲۸/۰	۱:۴
۱۰۰/۷	۱۴/۱	۱۴/۰	۱:۸
۱۰۷/۱	۷/۵	۷/۰	۱:۱۶

X.References

1.Felig P, Baxter JD, Broadus AE, Froham IA eds. Endocrinology and Metabolism (2nd ed.). New York: Mc Graw - Hill Book Co. 253,1967.

2.Braunstein GD, Rasor J, Adler D, Danzer H, Wade ME, Serum HCG Levels Throughout Normal Pregnancy. Am J Obstet Gynecol, 126:678:81,1976.

۳.Swainathan N, Bahl GP, Dissociation and Recombination of the Subunits of Human Chorionic Gonadotropin, Biochem Biophys Res Commun. 40:422-7,1970.

۴.Human Reproduction Unit, World Health Organization, Geneva, Switzerland. Assay of Protein Hormones Related to Human Reproduction: Problems of Specificity of Assay Methods and Reference Standards. Acta Endocrinol. 71:625-37,1972

۵.Ross Gt. Clinical Relevance of Research on the structure of Human Chorionic Gonadotropin. Am J. Obstet Gynecol. 129:795,1977.

۶.Lenton EA, Neal LM Sulaiman R. Plasma concentrations of Human chorionic gonadotropin from the time of implantation until the second week of pregnancy. Fertil. Steril 37;773-778,1982

۷.Wald N, Cuckle H, Wu TS, George L. Maternal serum uncongugated oestriol and HCG levels in twesn pregnancies; implications for screening for Down's syndrome. Br. J. Obstet Gynecol. 98;905-908,1991.

۸.Mildwidsky A, Adoni A, Miodovnik M, Segal S, and Palti Z. Human chorionic gonadotrophin (B-subunit) in the early diagnosis of ectopic pregnancy. Obstetrics and Gynecology. 51;725-726,1981.

9.Schwarz R.0. and Di Pietro D.L, B-HCG as a diagnostic aid for suspected ectopic pregnancy. Obstetrics and Gynecology, 56:203, 1980.

10. Braunstein GD, Karow WG, Gentry WC, Rasor J and Wade M.E. First trimester chorionic gonadotrophin measurements as an aid in the diagnosis of early pregnancy disorders. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 131:25-32,1978.

۱۱.Dawood M, Saxena B.B. and Landesman, R. Human chorionic gonadotrophin in its subunits in hydatidiform mole and choriocinoma. Obstetrics and Gynecology. 50:172-181, 1977.

۱۲.Papepetrou PD, Sakarelou NP, Baraouzi H and Fesas PH. Ectopic production of human chorionic gonadotrophin (HCG) by neoplasms. The value of measurements of immunoreactive HCG in the urine as a screening procedure. Cancer. 45;2583-2592, 1980.

۱۳.Donaldson ES, Van Nagell JR, Pursell S, Gray EC, Meeker WR et al. Multiple Biochemical Markers in Patients with Gynecological Malignancies. Cancer. 45:948-53,1980

۱۴.Skinner DG, Scardino PT, Daniels JR. Testicular cancer, Ann Rew Med. 32:534-57,1981

۱۵.Burtis CA, Ashwood ER, Fundamentals of clinical chimestry. 4th Edition: 789, 1999.

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: Apr 2021

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