

مقدمه:

نام آنابولیت: HCG یا گونادوتروپین جفتی انسان β -subunit or Human chronic Gonadotropin
ساختمان و متابولیسم: هورمونهای گلیکوپروتئینی مثل HCG, LH, FSH, TSH از دو زیر گروه یا subunit تشکیل شده اند، α -subunit که در همه آنها مشابه است و β -subunit که شاخص هورمون است. در مورد β -subunit HCG شامل 180 اسید آمینه با وزن مولکولی 25000-30000 دالتون بوده و اولین 150 اسید آمینه آن با LH قرابت آنتی ژنی دارد.

HCG توسط سلولهای تروفوبلاست سنتز می شود که نیمه عمر آن 12 تا 36 ساعت می باشد. از روز 6 تا 10 بعد از لقاح، سطح β -HCG در سرم بالا می رود. در حاملگی طبیعی با گذشت 4 تا 6 هفته بعد از بارداری β -subunit قابل تشخیص است. در موارد حاملگی خارج رحمی molar pregnancy و هیپرکتومی یا D&C سیر نزول β را شاهدیم که ممکن است از 11 تا 219 روز طول بکشد. مهمترین وظیفه HCG نگهداری جسم زرد است که تولید استرادیول و پروژسترون می کند. تولید زیر گروه های HCG تحت کنترل ژنتیکی است. وزن مولکولی آن 45000 دالتون است که تقریباً 30% کربو هیدرات و 9% اسید سالیسیلیک دارد. HCG در جنین مذکر، سلولهای لیدیک را که تولید کننده تستسترون هستند، تحریک و به تمایز جنسی کمک می کند.

معرفی آزمایش و کاربرد بالینی:

آزمایش کیفی به تشخیص حاملگی طبیعی کمک کرده و سریعتر ولی حساسیت کمتری دارد (20-50 MIU/ml). آزمایش کمی از روز سوم لقاح می تواند مثبت باشد. همچنین در حاملگی مولار یا اکتوپیک جواب مثبت می دهد. در موارد نادر جواب مثبت کاذب با LH وجود دارد و بیمار با LH خیلی بالا می تواند یک پاسخ Border Line (مرزی) نشان دهد. این آزمایش برای تشخیص سریع بارداری، حاملگی اکتوپیک، سقط جنین و مول موثر است. همچنین برای تشخیص تومورهای بیضه و نئوپلاسم کاربرد دارد. در کوریم کارسینوما، امبریال سل کارسینوما، میزان β HCG به شدت بالا می رود. اندازه HCG برای پیگیری نئوپلاسم جرم سل که تولید HCG می کند بخصوص نئوپلاسم تروفوبلاستیک روش سودمندی است. در نئوپلاسم های مردان، β HCG و AFP تواما اندازه گیری و بعنوان تومور مارکر موثر واقع می شوند. اندازه گیری سریال β HCG در پیگیری پاسخ به درمان و جراحی و شیمی درمانی کمک کننده است.

محدوده طبیعی:

در بانوان باردار بسته به هفته بارداری به شرح زیر می باشد:

هفته حاملگی	mIU/ml یا mu/L
≤ 1	50-10
2	500-50
3	1000-100
4	3000-1000
5	11500-3500
6-8	27000-12000

در مردان و بانوان غیر حامله $< 5 \text{ IU/L}$ و یا $< 5 \text{ mIU/ml}$ می باشد.

- جهت تشخیص بارداری، سرم هائی که با غلظت 10 IU/L هستند منفی، سرم هائی که از غلظت 25 IU/L به بالا می باشند مثبت و، سرم های ما بین 10-25 IU/L مشکوک تلقی می گردند. در مورد سرم های مشکوک و منفی به منظور حصول اطمینان باید حداقل 48 ساعت بعد نمونه گیری مجدد صورت گیرد و آزمایش تکرار گردد. در غلظت های بیش از 800 میتوان نمونه را با Sample Diluent رقیق نمود و بعد از بدست آوردن غلظت نمونه رقیق شده، عدد حاصله را در ضریب رقت ضرب نمود و غلظت نمونه اصلی را بدست آورد.

اساس آزمایش:

اساس این کیت به روش ساندویچ الیزا می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادی مونوکلونال بر علیه یک واحد آنتی ژنیک HCG، Coat میشوند. نمونه بیمار با آنتی بادی Coat شده در چاهکها مجاور می شود، سپس آنتی بادی ثانویه متصل به آنزیم HRP به چاهکها اضافه می شود که باعث ایجاد یک کمپلکس ایمنی می شود که نشانگر غلظت HCG در نمونه ها می باشد. در ادامه پس از شستشو، محلول رنگزا که حاوی H_2O_2 و کروموزن است به داخل چاهکها ریخته میشود و تولید رنگ آبی می کند که رنگ آبی تولید شده متناسب با کمپلکس ایمنی ایجاد شده در چاهکها می باشد. با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل میشود که بهترین جذب نوری را در طول موج 450 نانومتر دارد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

سرم یا پلاسما را می توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود. نمونه را می توان به مدت 24 ساعت در دمای 2 تا 8 درجه سانتی گراد و یا برای مدت زمان طولانی تر در دمای 20- درجه سانتیگراد نگهداری کرد.

(در ضمن باید از Freeze - Thaw نمودن پرهیز شود). نمونه شدیداً لیپمیک و رادیوایزوتوپها تا یک هفته روی نتیجه تاثیر می گذارند.

واکنش تداخلی: سرم همولیز، لیپمیک و رادیوایزوتوپها تا یک هفته روی نتیجه تاثیر می گذارند.

محتویات کیت:

- 1- یک عدد پلیت حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد HCG (Anti -HCG coated Plate) دارای 96 چاهک
- 2- سری استاندارد (Standard Set): 7 ویال استاندارد دارای غلظت های IU/L صفر، 10، 25، 100، 250، 500 که هر ویال محتوی 0.5 میلی لیتر می باشد.
- 3- سرم کنترل (Control Serum): یک ویال حاوی 0.5 میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص نوشته شده روی برچسب ویال.
- 4- محلول رقیق کننده نمونه ها (Sample Diluent): یک ویال حاوی 1 میلی لیتر برای رقیق کردن نمونه هائی که غلظت بالاتری از بالاترین استاندارد کیت را دارا می باشند.
- 5- محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate): یک ویال حاوی 12 میلی لیتر محلول حاوی HCG کنژوگه شده با HRP.
- 6- محلول اسی بافر (Assay Buffer): یک ویال حاوی 12 میلی لیتر محلول.

- 7- محلول شستشو (Washing Solution) : یک ویال حاوی 40 میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (25 X) که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف مقدار لازم از محلول شستشوی غلیظ را به نسبت 1/25 با آب مقطر رقیق کنید.
- 8- محلول رنگزا (Chromogen Substrate) : یک ویال حاوی 12 میلی لیتر و آماده برای مصرف.
- 9- محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال حاوی 12 میلی لیتر.
- 10- بر چسب مخصوص پلیت (Card Board Sealer)

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

- 1- دستگاه خوانش الیزا (Eliza Reader) دارای فیلتر 450 نانومتر و در صورت امکان 630 به عنوان فیلتر رفرانس.
- 2- سمپلر های 20 و 100 میکرولیتر دقیق
- 3- آب مقطر

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

- 1- محتویات این کیت برای مصرف در همین کیت می باشد .
- 2- از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جدا خودداری نمایید .
- 3- کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HIV, HCV, HBs AG کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند . جهت احتیاط بهتر است هر کاربری که با کیت کار می کند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزد .

توضیحات عمومی:

- 1- قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق رسانده و به خوبی تکان دهید تا کاملاً یکنواخت شوند.
- 2- بهتر است به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند .
- 3- از نوک سمپلر يك بار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید .
- 4- پس از افزودن محلول متوقف کننده ، جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .
- 5- برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند .
- 6- از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب ، زمان انکو باسیون مناسب می باشد ، 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 عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیقتری میشود.
- 7- بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه ها پیش از 5 دقیقه به طول نیانجامد .

مراحل انجام آزمایش :

- 8- تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب نموده و باقی چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .
- 9- 25 میکرولیتر از هر استاندارد ، سرم کنترل و نمونه را به داخل هر چاهک بریزید ، پیشنهاد می گردد که از استانداردها و نمونه ها به صورت 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 .
- 10- 100 میکرولیتر از محلول Assay buffer را به هر چاهک اضافه نموده و پلیت را به آرامی به مدت 15 ثانیه تکان دهید تا محتویات آن بخوبی مخلوط شوند .
- 11- درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت 30 دقیقه در درجه حرارت اتاق (22-28 درجه سانتیگراد) انکوبه نمایید .
- 12- محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را 5 بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشوئید (برای شستشو می توان از سمپلر 8 کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از يك چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد). در هر دفعه شستشو حدود 300 میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها را درحالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی يك پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی محلول شستشو خارج شوند.
- 13- 100 میکرولیتر محلول آنزیم کونژوگه (Enzyme Conjugate) به هر چاهک اضافه نمائید و چاهکها را به مدت 30 دقیقه در درجه حرارت اتاق انکوبه نمائید
- 14- محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را 5 بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشوئید.
- 15- 100 میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen – Substrate) به هر چاهک اضافه نمائید و چاهکها را به مدت 15 دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمائید .
- 16- با اضافه کردن 100 میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمائید . برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الیزا ریدر با فیلتر 450 nm استفاده نمائید . (توصیه می شود از فیلتر 630 nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد).

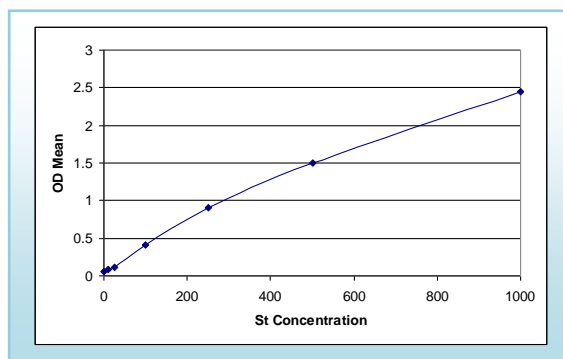
شرایط نگهداری فرآورده تشخیصی:

- 1- دمای نگهداری کیت بین 2-8 C می باشد و بهتر است که در 4C نگهداری شود .
- 2- با توجه به انجام تست های Full Term , accelerate این کیت در صورت رعایت موارد نگهداری صحیح تا 12 ماه پایدار می باشد و در این مدت کیت حاضر بالای 90 درصد کارایی اولیه را داراست. با توجه به آزمایشات انجام شده در صورت باز نمودن کیت یک ماه پایدار می باشد .
- 3- چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمائید .
- 4- **توجه :** در صورت باز شدن درب کیت و محلول ها تا زمانی که آلودگی میکروبی و قارچی رخ ندهد کیت پایدار خواهند بود.

محاسبه نتایج :

- 1- جذب نوری استاندارد ها و نمونه ها را به کمک دستگاه Eliza Reader در طول موج nm450 و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس nm630 بخوانید.
- 2- با استفاده از میانگین جذب نوری استاندارد ها 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، در ادامه نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمائید تا منحنی بدست آید.
- 3- میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن را پیدا کنید، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمائید بطوریکه این خط کاملاً بر محور عمودی عمود باشد و در ادامه از محل تلاقی خط و منحنی، خطی عمود بر محور افقی وارد کنید، نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد.

جذب نوری	استانداردها (IU/L)	
0.05	0	St 1
0.08	10	St 2
0.12	25	St 3
0.41	100	St 4
0.9	250	St 5
1.5	500	St 6
2.45	1000	St 7



توجه: جذب های نوری و منحنی مربوط فقط به عنوان نمونه می باشند و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.
شاخصهای اجرایی:

- 1- حداقل مقدار قابل اندازه گیری:
 - 2- براساس جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت HCG قابل تشخیص در این کیت 1.0 IU/L می باشد.
 - 3- 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 آزمایشهای مختلف) با استفاده از 4 استاندارد با غلظتهای مختلف HCG انجام گردید که در جدول 1 و 2 آمده است.

جدول شماره 1 (اینترا-اسی)

نمونه	تعداد دفعات تکرار	میانگین IU/L	SD IU/L	CV%
1	12	25	5.2	3.1
2	12	100	25.6	4.3
3	12	250	45.6	3.5
4	12	500	67.3	2.7

جدول شماره 2 (اینترا-اسی)

نمونه	تعداد دفعات تکرار	میانگین IU/L	SD IU/L	CV%
1	5	25	0.62	6.1
2	5	100	31.5	5.1
3	5	250	67.4	4.4
4	5	500	75.2	5.2

هر سری آزمایش بصورت Duplicate انجام شده است.

- 3- خطی بودن آزمایش:
- به کمک استاندارد صفر رفتهای متوالی 4 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.
- جدول خطی بودن:

نمونه	مقدار HCG موجود در سرم رقیق نشده (mIU/L)	ریکوری (%)		
		رقت 25%	رقت 50%	رقت 75%
1	10	98	96	100
2	100	100	93	96
3	500	95	96	91

4- ریکواری آزمایش :

مقادیر معلومی از HCG به 4 سرم با غلظتهای مشخص HCG افزوده شد و ریکواری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول صفحه بعد آمده است .

جدول ریکواری :

ریکواری (%)	مقدار بدست آمده (IU/L)	مقدار مورد انتظار (IU/L)	مقدار افزوده شده HCG (IU/L)	مقدار HCG موجود در سرم (IU/L)	نمونه
96.5	19.3	20	25	15	1
97.6	105	107.5	200	15	1
101	414	407.5	800	15	1
92	50.3	54.5	25	84	2
93.6	133	142	200	84	2
97.5	431	442	800	84	2
96	144	150	25	275	3
88.8	211	237.5	200	275	3
101	545	537.5	800	275	3
94.8	320	337.5	25	650	4
103	440	425	200	650	4
96.8	702	725	800	650	4

5- اختصاصیت آزمایش :

اختصاصیت این آزمایش به کمک سرمهایی با غلظتهای مختلف human TSH, human FSH, human LH 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
<1	1000	hFSH(IU/L)
<1	500	
<1	100	
<1	1000	hLH(IU/L)
<1	500	
<1	100	
<1	1000	TSH(mIU/L)
<1	500	
<1	100	

6- اثر هوک (Hook Effect)

آزمایش HCG جهت سرمهایی با غلظت بسیار بالا از این آنالیت (500.000 IU/L) صورت گرفت که پدیده هوک مشاهده نشد .

References

1. Bagshave, K.D. (1984) Clinical applications of hCG. Adv. Exp. Med Biol. 176:313-324.
2. Braunstein, G.D., Rasor, J. and Adler, D. et al (1976) Serum human chorionic gonadotropin levels throughout normal pregnancy. Am. J. Obst. Gynec. 126:678.
3. Saller, B., Clara, R. and 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.
4. 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

Adress :

No:1161 , Bid Avenue , Payetakht , Industrial zone , Tehran , Iran

Tel : +98 21 66 56 91 84 - 66 59 37 41 Fax : +98 21 66 56 14 28

Email : info@biokarpira.com

www.biokarpira.com



043 ISO 9001-2008 13485