

کیت رپید الایزای تعیین غلظت گنادوتروپین جفتی

انسانی برای تشخیص بارداری

(۹۶ تستی)

Rapid human ChorionicGonadotropin(hCG) ELISA Kit For pregnancy Test

مقدمه :

گنادوتروپین جفتی انسان یک هورمون گلیکوپروتئینی است که توسط سلول های تروفوبلاست جفت در طی دوران بارداری ترشح می شود. غلظت گنادوتروپین جفتی انسان (hCG) در خون و ادرار در طی بارداری طبیعی بشدت افزایش می یابد. بعلاوه در بسیاری از تومورهای تروفوبلاستیک و غیرتروفوبلاستیک غلظت این گلیکوپروتئین افزایش می یابد. لذا تعیین غلظت سرمی hCG با سیستم های دقیق و صحیح اندازه گیری، راهی مطلوب برای تشخیص بارداری و اختلالات بارداری زودرس می باشد.

اساس روش اندازه گیری :

کیت الایزای hCG موجود، براساس سنجش ایمونولوژیکی آنزیمی ساندویچی تهیه شده است. hCG موجود در نمونه ها بعنوان آنتی ژن به دو آنتی بادی زوج اختصاصی خود متصل می گردد. هر دو آنتی بادی از نوع منوکلونال موشی هستند که یکی بر روی فاز جامد (چاهک ها) پوشش داده شده است و دیگری به آنزیم HRP متصل شده است. نمونه مورد آزمایش که دارای hCG است، در معرض دو آنتی بادی قرار می گیرد. پس از زمان انکوباسیون، چاهک ها تخلیه شده و شستشو داده می شوند تا آنتی بادی متصل به آنزیم HRP اضافی خارج گردد. سپس به هرچاهک سوپسترای آنزیم اضافه می شود که فعالیت آنزیم بطور مستقیم با غلظت hCG در نمونه ها متناسب است. استانداردهای hCG با غلظت مشخص، همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که براساس منحنی استاندارد جذب نور در مقابل غلظت hCG، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید.

معرف ها :

- ۱- میکروپلیت پوشش داده شده: شامل ۹۶ چاهک جداشدنی که با آنتی بادی منوکلونال موشی ضد hCG پوشش داده شده اند.
- ۲- کونژوگه آنزیمی (HRP-Anti-hCG): یک ویال ۶ میلی لیتری آماده مصرف.
- ۳- استانداردها: ۷ ویال یک میلی لیتری از استاندارد با غلظت های ۰، ۰۲۵، ۰۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ براساس mIU/ml که در سرم نرمال انسانی تهیه شده و از تیومرسال بعنوان نگهدارنده استفاده شده است.

- ۴- سرم کنترل: یک ویال یک میلی لیتری آماده مصرف.
- ۵- محلول شستشو دهنده غلیظ (20X): یک ویال ۵۰ میلی لیتری محلول شستشو که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف لازم است این محلول به نسبت ۱/۲۰ با آب یونیزه رقیق شود.
- ۶- محلول رنگ زا: یک ویال ۱۲ میلی لیتری محلول آماده مصرف
- ۷- محلول متوقف کننده واکنش: یک ویال ۱۲ میلی لیتری اسیدسولفوریک یک نرمال.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

- ۱- سمپلرهای ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری دقیق
- ۲- آب دیوینزه
- ۳- دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر فرانس.
- ۴- کاغذ جاذب رطوبت

نکات قابل توجه برای مصرف کنندگان :

- ۱- در این کیت از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر HbsAg و HIV منفی بوده اند.
- ۲- از تماس محلول متوقف کننده واکنش (1 N H₂SO₄) خودداری کنید. در صورت تماس، با آب فراوان آنرا بشوئید.
- ۳- از استفاده از مواد پس از تاریخ انقضاء خودداری کنید و از مخلوط کردن یا استفاده از کیت ها با شماره بچ مختلف پرهیز نمائید.
- ۴- درب ظروف را پس از استفاده ببندید و از تعویض درب ها جدا خودداری کنید.
- ۵- محلول های محتوی مواد افزودنی یا نگهدارنده مثل سدیم آزاید نباید در واکنش آنزیمی وارد شوند.
- ۶- این کیت فقط برای تشخیص بارداری طراحی شده است و برای موارد دیگر تعیین غلظت hCG کاربرد ندارد. در چنین مواردی از کیت های معمولی hCG این شرکت که زمان انکوباسیون نیم ساعت دارد، استفاده شود.

تهیه و جمع آوری نمونه :

- ۱- آزمایش را باید بر روی نمونه های سرمی انجام داد. نمونه های شدیداً همولیزه و دارای چربی باید حذف شوند.
- ۲- نمونه ها را می توان برای هفت روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد و برای زمان های طولانی تر (تا سی روز) در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمود.
- ۳- از انجماد و ذوب مکرر نمونه ها باید خودداری کرد.
- ۴- در مواردی که مقدار hCG نمونه بیش از ۱۰۰۰ mIU/ml باشد، نمونه را با استاندارد صفر رقیق نموده و سپس آزمایش را تکرار نمائید.

آماده سازی معرف ها :

- ۱- کلیه معرف ها را به دمای اتاق برسانید. قبل از استفاده آنها را به آرامی سر و ته نمائید.
- ۲- برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب دیونیزه رقیق نمائید.

روش انجام آزمایش :

۱- تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده آبیگر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنها ببندید.

۲- ۵۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر چاهک بریزید، پلیت را بمدت ۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها خوب مخلوط شوند سپس آنها بمدت پنج دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتیگراد) و تاریکی انکوبه کنید.

۳- محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را ۳ بار با ۳۰۰ میکرولیتر بافر شستشوی آماده مصرف بشوئید.

۴- ۵۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی (HRP-Anti-hCG) را به تمام چاهک ها اضافه کنید، پلیت را بمدت ۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها خوب مخلوط شوند سپس آنها بمدت پنج دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتیگراد) و تاریکی انکوبه کنید.

۵- محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را ۵ بار با ۳۰۰ میکرولیتر بافر شستشوی آماده مصرف بشوئید. برای شستشوی چاهک ها، ابتدا ۳۰۰ میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک ها را وارونه کرده و همراه با تکان دادن خالی کنید و در انتهای شستشو، با ضربات ملایم بر روی کاغذ جاذب تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.

۶- ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را بمدت ده دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

۷- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همه چاهک ها اضافه کنید. سپس جذب نور هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید). سنجش جذب نوری باید حداکثر تا ۳۰ دقیقه پس از اتمام آزمایش انجام شود.

توجه: چنانچه جذب نوری غلظت استاندارد ۱۰۰۰ بیش از ۲/۵ خوانده شد، مجدداً جذب نور هر چاهک را در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت نمائید.

محاسبه نتایج

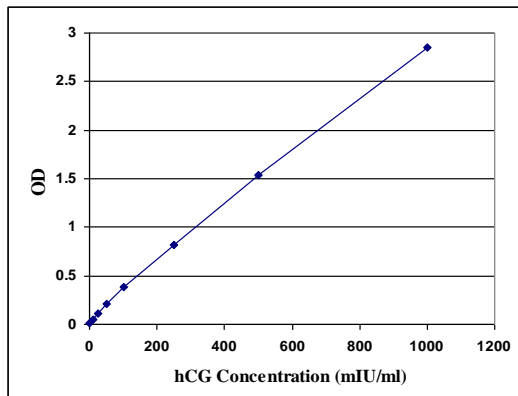
۱- با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) بر روی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد رسم کنید.

۲- میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنها پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

راهنمای محاسبه

مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل تنها بعنوان راهنمایی آورده شده است و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید بدست آورد.

ردیف	مقدار استاندارد (mIU/ml)	جذب
1	0	0.01
2	25	0.11
3	50	0.21
4	100	0.39
5	250	0.82
6	500	1.54
7	1000	2.85



مقادیر طبیعی

هر آزمایشگاهی لازم است تا براساس بافت جمعیتی، محدوده طبیعی مقادیر این هورمون را بدست آورد. مقادیر طبیعی در سرم افراد نرمال که توسط آزمایشات مکرر به روش الایزا بدست آمده است به قرار زیر می باشد:

محدوده طبیعی 0.5–10.0 mIU/ml

محدوده مشکوک 10.0–25.0 mIU/ml

چنانچه فردی در این محدوده مشکوک باشد، لازم است یک هفته بعد مجدداً خونگیری و آزمایش مجدد بعمل آید. همچنین در نمونه

هایی که در **Boarder line** قرار دارند، آزمایش مجدد حتما تکرار شود.

در افراد باردار طبیعی مقادیر در دوران مختلف (برحسب mIU/ml) بشرح ذیل است:

۲۵ - ۳۵	هفته اول
۳۵ - ۱۰۰	هفته دوم
۱۰۰ - ۱۰۰۰	هفته سوم
۱۰۰۰ - ۱۰۰۰۰	هفته چهارم
۳۰۰۰۰ - ۱۰۰۰۰۰	ماه دوم و سوم
۱۰۰۰۰ - ۳۰۰۰۰	سه ماهه دوم
۵۰۰۰ - ۱۵۰۰۰	سه ماهه سوم

خصوصیات کیت

۱- حساسیت

با تکرار و خوانش جذب استاندارد صفر، حساسیت کیت برای تعیین مقدار هورمون hCG، بر اساس محاسبه $0.0 + 3SD$ برابر 1 mIU/ml بدست آمد.

۲- دقت

برای محاسبه میزان دقت در یک روز و روزهای مختلف، آزمایش بر روی ۳ نمونه سرم ۲۰ بار تکرار شد که ضریب تغییرات به شرح ذیل است.

ضریب تغییرات در روز

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (mIU/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	20	78.2	5.9	7.6
2	20	353.8	20.8	5.9
3	20	850.6	39.1	4.6

ضریب تغییرات در روزهای مختلف

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (mIU/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	10	56.1	4.2	7.4
2	10	136.6	8.1	5.9
3	10	575.8	38.3	6.7

۳- ویژگی

آنتی بادی های منوکلونال مورد استفاده در این کیت ایزا اختصاصی hCG انسانی می باشند. هیچگونه تداخلی با LH ، FSH و TSH انسانی در غلظت های طبیعی دیده نشده است.

۴- خطی بودن

سه نمونه مختلف سرمی با استاندارد صفر به نسبت های ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۸ رقیق شدند. سپس غلظت hCG در آنها با استفاده از کیت محاسبه شد که نتایج ذیل بدست آمد.

نمونه سرمی	غلظت اولیه (mIU/ml)	درصد بازیابی		
		1:2	1:4	1:8
1	156	108	106	95
2	455	102	103	101
3	890	107	104	103

۵- اثر هوک

در این کیت، پدیده اثر هوک تا غلظت 200000 mIU/ml دیده نشد.