

کیت ایمونورادیومتریکی اسی برای تعیین غلظت هورمون گنادوتروپین جفتی انسانی

Human Chorionic Gonadotropin (HCG) IRMA Kit

مقدمه :

گنادوتروپین جفتی انسان یک هورمون گلیکوپروتئینی است که توسط سلول های تروفوبلاست جفت در طی دروران 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 IRMA hCG موجود، براساس سنجش ایمونولوژیکی رادیواکتیو 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 (لوله ها) پوشش داده شده است است و دیگری به ید- ۱۲۵ 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 ید- ۱۲۵ اضافی خارج گردد . سپس اکتیویته موجود در هر لوله توسط شمارنده گاما اندازه گیری می شود که این اکتیویته 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 مقدار شمارش مقابل غلظت hCG، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید.

معرف ها :

- ۱- لوله های پوشش داده شده: شامل ۱۰۴ لوله که با آنتی بادی منوکلونال موشی ضد hCG پوشش داده شده اند.
- ۲- ردیاب (آنتی بادی علیه hCG نشاندار شده به ید-۱۲۵): دو ویال ۱۲ میلی لیتری آماده مصرف.
- ۳- استانداردها: ۸ ویال یک میلی لیتری از استاندارد با غلظت های ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ mIU/ml که در سرم نرمال انسانی تهیه شده و از تیومرسال بعنوان نگهدارنده استفاده شده است.
- ۴- سرم کنترل: یک ویال 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 مقطر رقیق شود.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

- ۱- سمپلر ۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتری دقیق
- ۲- آب دیونیزه
- ۳- دستگاه شمارنده گاما

۴- کلفذ جاذب رطوبت

۵- لوله های آزمایش معمولی برای شمارش تام

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 استفاده از مواد پس از تاریخ انقضاء خودداری کنید و از مخلوط کردن یا استفاده از کیت ها با شماره بچ مختلف پرهیز نمایید.
- ۳- درب ظروف را پس از استفاده ببندید و از تعویض درب ها جدا خودداری کنید.
- ۴- از لباس و دستکش یکبار مصرف هنگام کار با مواد رادیواکتیو استفاده کنید.
- ۵- لوازم آزمایشگاهی آلوده به مواد رادیواکتیو جداگانه و با روش های ایمن (براساس دستورالعمل های حفاظت در برابر اشعه) شستشو و یا پسماند نماید.

تهیه و جمع آوری نمونه :

- ۱- آزمایش را باید بر روی نمونه های سرمی و پلاسمایی 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- معرف ها باید مستقیماً ته لوله ریخته شوند.
- ۵- از تماس نوک سمپلر با ته لوله خودداری کنید.

آماده سازی معرف ها :

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

روش انجام آزمایش :

- ۱- تعداد لوله های پوشش شده برای استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید. برای شمارش تام از لوله های معمولی استفاده کنید.
- ۲- ۵۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر لوله بریزید.
- ۳- لوله ها را بمدت ۳۰ دقیقه در همزن گردان مخصوص شرکت پادتن گستر ایثار و یا شیکر افقی (با سرعت 280 rpm) در درجه حرارت اتاق (۱۸ تا ۲۵ درجه سانتیگراد) انکوبه کنید.
- ۴- محتویات لوله ها را از طریق مکش یا وارونه کردن تخلیه نمایید (بجز لوله های شمارش تام). سپس لوله ها را دو بار و هر بار با دو میلی لیتر محلول شستشوی آماده مصرف شستشو دهید. برای اطمینان از تخلیه کامل، با وارونه نگهداشتن لوله ها بر روی کاغذ جاذب و با ضربت ملایم بر روی لوله تمامی مایع موجود در لوله ها را تخلیه کنید.
- ۵- ۲۰۰ میکرولیتر از ردیاب را به تمام لوله ها اضافه کنید.

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

۱۰ - ۳۰	هفته اول
۳۰ - 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 hCG، بر اساس محاسبه $0.0 + 3SD$ برابر 2.0 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	55.3	4.04	7.3
2	20	254.7	13.0	5.1
3	20	735.6	28.7	3.9

ضریب تغییرات در روزهای مختلف

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (mIU/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	10	105.3	8.6	8.2
2	10	220.4	13.9	6.3
3	10	512.4	26.1	5.1

۳- ویژگی

آنتی بادی های منوکلونال مورد استفاده در این کیت الایزا اختصاصی hCG انسانی می باشند. هیچگونه تداخلی با TSH، LH و FSH 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 بازبایی		
		1:2	1:4	1:8
1	457	98	104	108
2	874	96	101	102
3	954	102	104	105

۶- سپس لوله ها را بمدت ۳۰ دقیقه در همزن گردان مخصوص شرکت پادتن گستر ایثار و یا شیکر افقی (با سرعت 280 rpm) در درجه حرارت اتاق (۱۸ تا ۲۵ درجه سانتیگراد) انکوبه کنید.

۷- محتویات لوله ها را از طریق مکش یا وارونه کردن تخلیه نمائید (بجز لوله های شمارش تام). سپس لوله ها را دو بار و هر بار با دو میلی لیتر محلول شستشوی آماده مصرف شستشو دهید. برای اطمینان از تخلیه کامل، با وارونه نگهداشتن لوله ها برروی کاغذ جاذب و با ضربت ملایم برروی لوله تمامی مایع موجود در لوله ها را تخلیه کنید.

۸- با استفاده از شمارنده گاما، اکتیویته موجود در لوله ها را بمدت یک دقیقه شمارش کنید.

محاسبه نتایج

۱- با استفاده از میانگین شمارش استاندارد ها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد رسم کنید.

۲- میانگین شمارش برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا 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 شمارش 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)	شمارش (n=3)	B/T(%)
0	شمارش تام	100440	----
1	0	205	0.20
2	10	811	0.81
3	25	1673	1.67
4	50	3224	3.21
5	100	5270	5.25
6	250	9046	9.01
7	500	21927	21.83
8	1000	32229	32.09

مقادیر طبیعی

بدلیل اختلافات سنی، نژادی و رژیم تغذیه، نمی توان برای تمام جمعیت ها محدوده مرجع تعیین کرد. بنابراین هر آزمایشگاه باید محدوده مرجع خود را گزارش نماید. در نمونه هایی که در Boarder line قرار دارند، آزمایش مجدد حتما تکرار شود.

مقادیر طبیعی در سرم افراد نرمال که توسط آزمایشات مکرر به روش IRMA بدست آمده است به قرار زیر می باشد:

0.0 – 5.0 mIU/ml