

اهمیت بالینی

گنادوتروپین جفتی انسان (hCG) گلیکوپروتئینی است که در زنان باردار در ابتدا از سلول های تروفوبلاست ابتدایی همزمان با لانه گزینی جنینی و در نهایت توسط جفت تولید و ترشح می شود. hCG از دو زیر واحد آلفا و بتا تشکیل شده که زیر واحد بتا مسئول ایجاد خصوصیات بیولوژیکی آن است. تولید hCG در طول سه ماهه اول بارداری به طور پیوسته افزایش می یابد و در حدود هفته دهم بارداری به بیشترین مقدار می رسد و در ادامه بارداری سطح hCG به آهستگی کاهش می یابد. میزان hCG در بارداری های دو قلوئی یا چند قلوئی به دلیل افزایش توده جفت نسبت به بارداری های تک قلوئی بالاتر است در حالی که در بارداری هایی که توده جفت به مقدار کافی وجود ندارد میزان hCG پایین تر از بارداری های طبیعی و نرمال است که می تواند با بارداری های خارج رحمی و یا با خطر سقط جنین مرتبط باشد. این کیت برای اندازه گیری کمی سطح hCG در نمونه سرم انسان به روش الایزا کاربرد دارد.

اصول آزمایش

اساس این آزمایش الایزای ساندویچ می باشد. نمونه ها، کالیبراتورها و کنترل به چاهک های حاوی آنتی بادی ضد hCG تثبیت شده اضافه می شوند. پس از شستشوی چاهک ها، hCG کوئزوگه شده با آنزیم HRP در چاهک ها ریخته می شود. پس از به تعادل رسیدن واکنش و شستشوی مجدد چاهک ها، با اضافه کردن محلول سوبسترای آنزیم HRP، رنگ آبی تشکیل شده که با افزودن محلول متوقف کننده تبدیل به رنگ زرد می گردد. محصول نهایی تولید شده در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین

میزان جذب نوری را دارد. مقدار رنگ ایجاد شده و در نتیجه میزان جذب، با غلظت hCG موجود در نمونه ها و کالیبراتورها نسبت مستقیم دارد. در نهایت غلظت hCG موجود در نمونه ها توسط منحنی استاندارد (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می گردد.

محتویات کیت

۱) کالیبراتورها (Calibrators) ۱ میلی لیتر:
شامل ۷ ویال کالیبراتور دارای قطره چکان، با غلظت های ۰.۰، ۱۰.۰، ۲۵، ۵۰.۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ (mIU/mL).
نکته: کالیبراتورها بر پایه سرم انسانی تهیه شده.

۲) محلول کوئزوگه آنزیمی (hCG Enzyme Conjugate) ۱۲ میلی لیتر:

یک ویال قطره چکانی شامل محلول آنتی بادی نشان دار شده با آنزیم.

۳) پلیت ۹۶ تستی :

دو پلیت حاوی آنتی بادی تثبیت شده که به همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی بسته بندی شده است.

۴) محلول شستشو غلیظ (Wash Buffer -20X) ۵۰ میلی لیتر:

یک ویال شامل سورفاکتانت محلول شده در بافر فسفات.

۵) محلول سوبسترا (Substrate Solution) ۱۲ میلی لیتر:

دو ویال قطره چکانی، حاوی محلول تترا متیل بنزیدین (TMB) و محلول هیدروژن پراکسید (H2O2) در بافر.

۶) محلول متوقف کننده (Stop Solution) ۱۲ میلی لیتر:

یک ویال قطره چکانی، حاوی محلول متوقف کننده واکنش.

۷) سرم کنترل (hCG Control):

ویال(های) حاوی ۰/۵ میلی لیتر سرم کنترل.

۸) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent-10X) ۱۰ میلی لیتر:

یک ویال بافر رقیق کننده نمونه.

۹) برچسب مخصوص پلیت:

دو ورق.

توجه ۱: کلیه اجزای کیت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود. محلول متوقف کننده را می توان در دمای اتاق نیز نگهداری کرد.

توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در برگه COA درج شده است.

موارد احتیاط در استفاده از کیت

این کیت برای انجام تست های تشخیصی در محیط های آزمایشگاهی کاربرد دارد. محتویات کیت منشأ سرم انسانی داشته و از نظر عدم وجود HBsAg و آنتی بادی های ضد HIV1/2 و HCV کنترل شده اند، اما از آنجا که هیچ روشی به طور صد درصد نمی تواند منفی بودن این موارد را تأیید نماید، بنابراین لازم است هنگام استفاده از کیت، مراقبت های لازم به عمل آورده شود.

• محتویات تعبیه شده در این کیت برای استفاده در همین سری ساخت بوده و از استفاده مشترک با سایر سری ساخت ها خودداری فرمایید.

• برای دریافت نتایج بهتر و دقیق تر فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ چاهک ها رعایت گردد. تعداد نمونه ها، فاصله زمانی سمپلینگ و زمان انجام تست باید متناسب باشد. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل این نکته حائز اهمیت است. دقت نمایید محلول ها نزدیک به ته چاهک ریخته شوند.

• شستشوی نامناسب می تواند باعث بوجود آمدن نتایج اشتباه در آزمایش شود.

• کلیه محلول ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از استفاده از محلول هایی که تاریخ انقضاء آن ها گذشته است خودداری نمایید.

جمع آوری و تهیه نمونه ها

• نمونه مورد استفاده در این آزمایش سرم انسانی می باشد که از خون سیاهرگی تهیه شده و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول های خونی جدا می گردد. حتی الامکان از نمونه های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید. نمونه های پلاسما جهت انجام این تست مناسب نمی باشند. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه گیری در درستی نتایج به دست آمده تأثیرگذار خواهد بود.

• نگهداری سرم باید در لوله های در بسته انجام شود. نمونه ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد قابل نگهداری می باشد و در صورت استفاده برای مدت زمان طولانی تر (حداکثر تا ۳۰ روز) در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شوند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه ها خودداری کنید.

آماده سازی محلول ها

محلول شستشو: حجم ۵۰ میلی لیتر از محلول شستشو (20X) را با ۹۵۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر برسانید. محلول آماده شده را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را

در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.

محلول رقیق کننده نمونه: مقدار متناسب با نیاز از محلول رقیق کننده نمونه (10X) را به نسبت ۱:۹ با آب مقطر رقیق کنید. به عنوان مثال، برای ساختن ۱ میلی لیتر محلول آماده مصرف، ۱۰۰ میکرو لیتر محلول رقیق کننده نمونه (10X) را به ۹۰۰ میکرو لیتر آب مقطر اضافه کنید.

مراحل انجام تست

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی گراد) رسیده اند. کلیه ویال های کالیبراتور، نمونه ها و کنترل را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت نمایید.

۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام آزمایش را جدا نموده و چاهک های باقی مانده را به همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده، درب آن را ببندید و در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۵۰ میکرو لیتر (یک قطره) از کالیبراتورها، نمونه های بیمار و کنترل را در داخل چاهک های مورد نظر بریزید. پیشنهاد می شود از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک ها ریخته شود و از میانگین جذب نوری آنها استفاده شود.

توجه: چاهک اول به عنوان بلانک در نظر گرفته شود. در این چاهک نمونه، کنترل و یا کالیبراتور ریخته نشود. بقیه مراحل همانند سایر چاهک ها می باشد.

۳) چاهک ها را با برچسب مخصوص بپوشانید و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۴) محتویات چاهک ها را در روش دستی با وارونه کردن پلیت و در روش دستگاهی با آسپیره کردن کاملاً تخلیه نمایید.

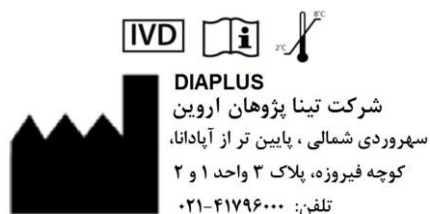
۵) چاهک ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرو لیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت گیر بزنید.

۶) حجم ۵۰ میکرو لیتر (یک قطره) از محلول کوئزوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه نمایید.

۷) چاهک ها را با برچسب مخصوص بپوشانید و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

- Batzer F. "Hormonal Evaluation of Early Pregnancy", *Fertility and Sterility*, **34**, 1-12. (1980).
- Braunstein, G.D., et al., "First-Trimester Chorionic Gonadotropin Measurements as an Aid to the Diagnosis of Early Pregnancy Disorders", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **131**, 25-32. (1978).
- Lenton E., Neal L. and Sulaiman R., "Plasma Concentrations of Human Gonadotropin from the time of Implantation until the Second Week of Pregnancy", *Fertility and Sterility*, **37**, 773-78. (1982)

در صورت بروز هرگونه مشکل با بخش پشتیبانی شرکت تینا پژوهان آروین تماس حاصل فرمایید.



No.	Sample mIU/mL	Added mIU/mL	Exp. mIU/mL	Obs. mIU/mL	% Rec.
1	65.3	42.1	53.7	53.1	98.8
2	110.6	210.5	160.5	159.11	99.13
3	222.5	36.11	129.3	130.8	101.2

Linearity

در این تست، غلظت hCG در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $\text{Bias} < 10\%$ است.

No.	Sample mIU/mL	1/2	1/4	1/8	1/16
1	111.1	-3.1	1.2	1.5	-1.8
2	234.57	2.2	-2.1	-1.8	2.5
3	614.3	3.1	-3.3	2.2	1.4

Cross Reactivity

اختصاصیت این آزمایش با اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مداخله‌گر به سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین دوز ماده مداخله‌گر به دوز hCG مورد نیاز برای همان مقدار جذب ارزیابی شد.

Hormone	Cross Reactivity	Concentration
hCG	1	-
β hCG	<0.0001	1000 mIU/mL
FSH	<0.0001	1000 mIU/mL
LH	<0.0001	1000 mIU/mL
TSH	<0.0001	1000 mIU/mL

Sensitivity

بر اساس جمع میانگین جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت 0.553 mIU/mL می‌باشد.

منابع

- Kosasa T.S., "Measurement of Human Chorionic Gonadotropin", *Journal of Reproductive Medicine* **26**, 201-6. (1981)
- Danzer H., Braunstein G.D., et al., "Maternal Serum Human Chorionic Gonadotropin Concentrations and Fetal Sex Predictions", *Fertility and Sterility* **34**, 336-40. (1980)
- Braunstein G.D., et al., "Serum Human Chorionic Gonadotropin Levels through Normal Pregnancy", *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **126**, pg 678-81. (1976)
- Goldstein D.P., and Kosasa T.S., "The Subunit Radioimmunoassay for HCG Clinical Application", *Gynecology* **6**, 145-84. (1975).

- مقادیر مورد انتظار hCG در دوره حاملگی نرمال

Expected Ranges (mIU/mL)	
First Week	10-30
Second Week	30-100
Third Week	100-1000
Fourth Week	1000-10,000
2 nd and 3 rd Month	30,000-100,000
2 nd Trimester	10,000-30,000
3 rd Trimester	5000-15,000

نمونه‌هایی که مقدار hCG در آنها کمتر از 10 mIU/mL باشد، منفی محسوب شده و نمونه‌هایی که مقدار hCG در آنها بیشتر 25 mIU/mL باشد، مثبت در نظر گرفته می‌شود. همچنین نمونه‌هایی که مقدار hCG در آنها در محدوده $10-25 \text{ mIU/mL}$ قرار می‌گیرد، مشکوک تلقی می‌شوند.

نکته: برای تأیید نتیجه نمونه‌هایی که سطح hCG آن‌ها در محدوده 10 mIU/mL تا 25 mIU/mL قرار می‌گیرد باید ۴۸ ساعت بعد مجدداً نمونه‌گیری انجام شده و آزمایش تکرار شود.

پارامترهای کنترل کیفی

Intra – Assay

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش $\text{CV} < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean hCG mIU/mL	11.3	58.4	260.6
SD (mIU/mL)	0.63	2.91	10.3
CV (%)	5.6	5	3.9

Inter – Assay

دقت بین‌تستی با ارزیابی نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با غلظت‌های متفاوت در چهار نوبت کاری (هر نوبت پنج بار تکرار) بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش $\text{CV} < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean hCG mIU/mL	18.6	112.3	224.5
SD (mIU/mL)	1.18	5.84	9.11
CV (%)	6.3	5.2	4.1

Recovery

در این تست دو نمونه سرم به‌نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به‌عنوان یک نمونه، مقدار hCG در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $\text{Bias} < 10\%$ است.

(۸) محتویات چاهک‌ها را در روش دستی با وارونه کردن پلیت و در روش دستگاهی با آسپیره کردن کاملاً تخلیه نمایید.

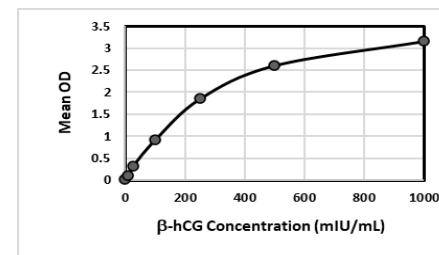
(۹) چاهک‌ها را مطابق با بند ۵ شستشو دهید.

(۱۰) حجم ۱۰۰ میکرولیتر (دو قطره) از محلول سوبسترا به چاهک‌ها اضافه نمایید و با برچسب پلیت بپوشانید. سپس پلیت را به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری فرمایید.

(۱۱) حجم ۵۰ میکرولیتر (یک قطره) محلول متوقف‌کننده به چاهک‌ها اضافه نموده و به‌مدت ۲۰-۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید.

(۱۲) جذب نوری چاهک‌ها را در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر با روش Point to Point کمتر از ۱۵ دقیقه بخوانید. از طول‌موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ استفاده نمایید.

Calibrators	Well Number	Abs	Mean Abs	Value (mIU/ml)
Cal A	A1	0.023	0.025	0
	B1	0.027		
Cal B	C1	0.124	0.120	10
	D1	0.116		
Cal C	E1	0.184	0.179	25
	F1	0.175		
Cal D	G1	0.666	0.674	100
	H1	0.682		
Cal E	A2	1.576	1.580	250
	B2	1.585		
Cal F	C2	2.606	2.612	500
	D2	2.618		
Cal G	E2	3.150	3.153	1000
	F2	3.156		



نکته: جذب نوری به دست آمده از کالیبراتورها و همچنین منحنی فوق فقط به‌عنوان مثال ذکر شده و در هر آزمایشگاهی در هر مرتبه آزمایش باید منحنی جدیدی ترسیم گردد.

مقادیر مورد انتظار

شرکت تولید کننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر برای آنالیت مورد نظر باید توسط آزمایشگاه مصرف‌کننده تعیین گردد.