

β-hCG (IRMA)

کیت تشخیص رادیوایمونومتریک گنادوتروپین جفتی

مقدمه :

هورمون β-Hcg یک هورمون گلیکوپروتئینی با وزن ملکولی ۳۸۰۰۰ دالتون می باشد که در طول بارداری ترشح می شود و علاوه بر ساختمان گلیکوپروتئینی دارای ۳۰٪ کربوهیدرات و ۹٪ اسید سیالیک می باشد. زنجیره بتا با ۳۰ اسید آمینه با انتهای C-Terminal مشخص می شود که برای هر هورمون اختصاصی می باشد. از مهمترین وظایف هورمون hcg حمایت و تقویت کردن هورمون LH در فرآیند تولید پروژسترون و استروژن می باشد. در نتیجه در شکل گیری تفاوت‌های جنسی نر و ماده دخالت دارد.

اساس روش اندازه گیری :

کیت رادیوایمونومتریکی اسی سنجش β-hCG بر اساس رادیوایمونومتریکی غیر رقابتی تک مرحله ای می باشد. در این آزمایش از دو آنتی β-hCG مونوکلونال بسیار اختصاصی که با توانایی تشخیص دو ملکول اپیتوپ متفاوت را داراست، استفاده می شود. یک آنتی بادی که بصورت فاز جامد کوت شده در لوله می باشد و دیگری بعنوان I 125 TRACER استفاده می شود. هر دوی این آنتی بادی ها همزمان با آنتی ژن های β-hCG موجود در استاندارد، سرم کنترل و نمونه واکنش می دهند. مواد غیر اختصاصی در مرحله شستشو از واکنش خارج می شوند میزان فرم اکتیویته موجود در لوله با غلظت β-hCG نمونه رابطه مستقیم دارد. استانداردهای β-hCG با غلظت مشخص همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که براساس منحنی استاندارد مقدار شمارش در مقابل غلظت β-hCG ، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید.

تهیه و جمع آوری نمونه :

این تست را میتوان مستقیم بر روی نمونه های سرم انسانی یا پلاسما انجام داد. ولی اگر قرار است آزمایش در طی ۲-۳ روز بعد انجام شود بهتر است در یخچال در دماهای ۸-۲۰ درجه سانتیگراد و اگر برای اهداف طولانی مدت ۱۵-۱۰ روز می باشد باید در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شود. از انجماد و ذوب مکرر خودداری شود. برای جلوگیری از ایجاد واکنش های مداخله کننده برای هر تست از یک سمپلر استفاده کنید معرف ها باید قبل از آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط قرار بگیرند. بهتر است که برای انجام آزمایش بصورت دوپل یا دوتایی استفاده شود و از میانگین آنها به جواب صحیح برسید.

محتویات کیت :

Kit Contents	Quantity (100T)
1. Coated Tubes Main : Anti - β hCG monoclonal antibody	100 Test Tubes (50 EA / Rack*2)
2. I 125 Tracer Main: Anti - β hCG monoclonal antibody Labelled with I 125 Diluent solution : BSA - PBS Preservative : Sodium Azide	10ml*1vial Radioactivity 592KBq (Ready to use)
3. Standards : (Range:0,5,20,50,100,500,1000,2500mIU/ml) Main : β-hCG of each concentration Diluent solution : BSA - PBS Preservative : Sodium Azide	1 ml × 8 vials (Ready to use)
4. Control Serum Concentration : 220-270 mIU/ml Diluent solution : BSA - PBS Preservative : Sodium Azide	1 ml × 1 vials (Ready to use)
5. Serum Diluent Diluent solution : BSA - PBS Preservative : Sodium Azide	50 ml × 1 vials (Ready to use)

نکات قابل توجه :

- 1- در این کیت از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر HBS AG و HIV منفی می باشد.
- 2- از استفاده مواد بعد از تاریخ انقضاء خود داری فرمائید.
- 3- از مخلوط کردن با کیت های تاریخ گذشته اجتناب ورزید.
- 4- از لباس و دستکش یکبار مصرف برای کار با مواد رادیو اکتیو استفاده کنید.
- 5- لوازم آزمایشگاهی آلوده به مواد رادیو اکتیویته را بوسیله روش های مراقبت در برابر اشعه و روش های ایمن شستشو و بسماند نمایید.
- 6- معرف ها باید قبل از مصرف به دمای اتاق یا محیط برسند.
- 7- هرگز محلول کیت هایی که دارای LOT متفاوتی هستند با هم مخلوط نکنید.

محاسبه نتایج :

1. با استفاده از میانگین شمارش استانداردها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) بر روی کاغذ میلیمتری ، منحنی استاندارد رسم کنید.
2. میانگین شمارش برای هر نمونه را بدست آورید و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی استاندارد وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X ها ایجاد می شود که بیانگر میزان غلظت نمونه است.

مقادیر طبیعی :

مقادیر طبیعی در سرم افراد نرمال که توسط آزمایش های مکرر به روش رادیوایمونومتریکی اسی بدست آمده است به قرار زیر است :

Healthy Males or non-pregnant Females	0 - 10 mIU/ml
Women in Pregnancy	
9 - 12 days after ovulation	30 - 100 mIU/ml
12 - 21 after ovulation	60 - 2000 mIU/ml
1 st Trimester peak (6-12weeks)	20000 - 300000 mIU/ml
2 nd Trimester	10000 - 120000 mIU/ml
3 ra Trimester	5000 - 30000 mIU/ml

حساسیت :

حداقل غلظت سرمی قابل اندازه گیری با این روش در مقایسه با استاندارد صفر میزان 0.23 mIU/ml است .

اختصاصی بودن :

در این تست علامت مشخصی از واکنش متقاطع بین میزان بالای FSH - LH و PRL مشاهده نشده است.

دقت :

برای ارزیابی دقت تست اعم از تکرارپذیری و تولید دوباره (inter and intra Assay) روی ۳ سرم با غلظت مشخص β-hCG انجام می شود.

Sample	Intra assay		Inter assay		n
	Mean ± SD (mIU/ml)	C.V (%)	Mean ± SD (mIU/ml)	C.V (%)	
1	20.2 ± 0.5	2.4	20.8 ± 1.0	4.6	5
2	500 ± 6.0	1.2	502.4 ± 12.2	2.4	
3	1502.7 ± 15.0	1.0	1515.8 ± 30.5	2.0	

$$*C.V. (%) = S.D \text{ of sample (mIU/ml)} / \text{Mean of sample (mIU/ml)} \times 100$$

نکته : برای غلظت های بالاتر از 2500 mIU/ml باید با محلول رقیق کننده به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شود و بعد از خواندن آزمایش با گاماکانتر و بدست آوردن نتیجه در ضریب رقت ضرب کنید.

ریکاوری :

برای انجام ریکاوری دو نمونه سرم با غلظت مشخص را به سه استاندارد مختلف (500 - 50 - 5 mIU/ml) اضافه می کنیم.

دو نمونه سرم :

حداقل غلظت 15 mIU/ml و متوسط غلظت 250 mIU/ml

Control Serum : 150 - 250 mIU/ml

Sample (mIU/ml)	Added (mIU/ml)	Expected Value (mIU/ml)	Calculated Value (mIU/ml)	Recovery (%)
10.8	5	7.87	7.51	95.4
	50	30.37	28.50	93.8
	100	55.37	57.70	104.2
60.2	5	32.57	31.25	95.4
	50	55.07	52.11	94.6
	100	80.07	84.60	105.7

$$*Recovery(%) = \text{Calculated Value (mIU/ml)} / \text{Expected Value (mIU/ml)} \times 100$$

نمودار استاندارد :

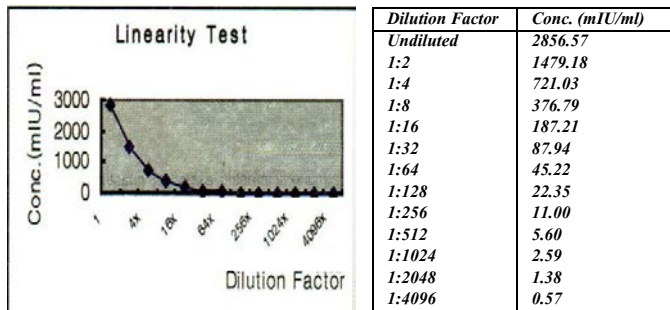
برای محاسبه درصد اتصال رادیو اکتیویته کنترل، استاندارد و نمونه ها از فرمول زیر محاسبه میشوند:

Description	CPM	B/Bmax (%)	Conc. (mIU/ml)
Total Activity	229786		
Std 1 0 mIU/ml	284	0.2	
Std 2 5 mIU/ml	872	0.5	
Std 3 20 mIU/ml	2744	1.6	
Std 4 50 mIU/ml	6386	3.7	
Std 5 100 mIU/ml	10614	6.2	
Std 6 500 mIU/ml	44502	26.0	
Std 7 1000 mIU/ml	79098	46.2	
Std 8 2500 mIU/ml	171181	100	
Control Serum	19224	11.2	201.6

$$*B/Bmax = \text{Solid phase cpm} / \text{Standard 2500 (mIU/ml) cpm} \times 100(%)$$










آزمایش خطی بودن :

با رقیق سازی یک نمونه سرم با محلول BSA به میزان ۵٪ نتایج زیر بدست آمده است:



References :

1. Kondo K, Imagawa M, lwasa S, ET al: A specific and sensitive sandwich enzyme immunoassay for human chorionic gonadotropin using antibodies against the carboxyterminal portion of the β -subunit. Clin Chim Acta 138:229-235; 1984
2. Braunstein GD, Et Al: Ectopic production of human chorionic gonadotropin by neoplasms. Ann Intern Med; 78:39; 1973
3. Birken S., Canfield R.E., 'Isolation and Aminoacid sequence of COOH-terminal Fragments from the Beta subunit of Human Chorionic gonadotropin' The Journal of Biological Chemistry. 252:5386-5392; 1977
4. Braunstein G.D., "Human Chorionic Gonadotropin in non trophoblastic Tumors and Tissues" in Recent advance in reproduction and regulation of Fertility. (Talwar G.P., ed.) New York Elsevier - North Holland Bilmedical Press, 389-397 ; 1979

	Used by	LOT	Batch code
	Temperature limitation	CONTROL	Control
	Store between	CAL	Standard
	Caution, consult accompanying documents	CT	Coated Tube
	Biological risk	TRAC	Tracer
	Consult instructions for use	WASHB	Wash Buffer
	In vitro diagnostic medical device		Radioactive material
	Manufacturer	REF	Catalogue number

آدرس کارخانه :

شهرک صنعتی اشتهارد - بلوار ابوриحان بیرونی - بلوار غزالی غربی - لادن ۲ -

شرکت پادیاب طب

تلفن : ۰۲۶ - ۳۷۷۷۵۵۳۲ - ۹

فکس : ۰۲۶ - ۳۷۷۷۵۵۲۹

پشتیبانی فنی : ۰۹۱۲۸۹۳۰۰۴۸

دفتر مرکزی: تهران - ۲۴ متری سعادت آباد - خیابان یکم شرقی - خیابان شب بو

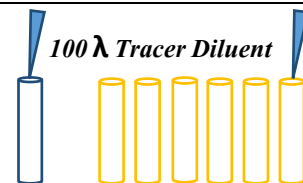
شرقی - پلاک ۱۷ - طبقه ۲

آدرس اینترنتی : www.padyabteb.com

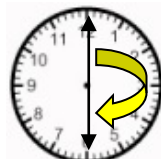
ایمیل شرکت : info@padyabteb.com



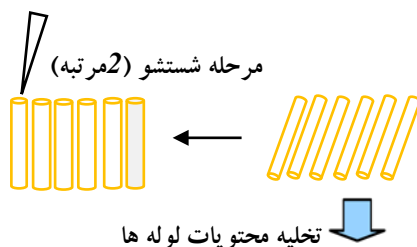
شرکت پادیاب طب
تلفن سوالات فنی : ۰۹۱۲۸۹۳۰۰۴۸



۶ از ردیاب یا $100 \mu\text{l}$ **Tracer Diluent** را به تمام لوله ها اضافه می کنیم.



30 دقیقه بر روی شیکر **300 RPM**



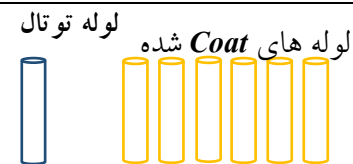
تخلیه محتویات لوله ها

۸ ابتدا محتویات لوله تخلیه و سپس شستشو با حجم **2cc آب مقطر** در 2 نوبت به غیر از لوله توتال انجام می شود.

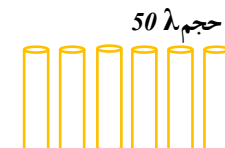


Gamma Counter Machine

۹ با استفاده از دستگاه گاما کانتر ظرف مدت **1 دقیقه** اکتیویته موجود در لوله ها خوانده می شود.

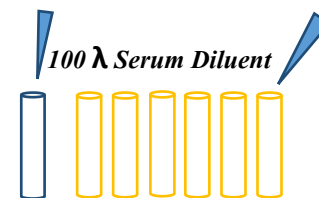


استاندارد، کنترل و نمونه



۱ تعداد لوله های کوت شده را برای استاندارد، کنترل و نمونه دوبل یا دوتایی قرار دهید. برای شمارش تمام از لوله های معمولی استفاده می شود.

۲ از استاندارد ها، کنترل سرم و نمونه بیمار را به داخل هر لوله اضافه می کنیم. (به جز لوله توتال).

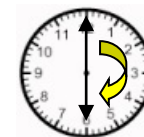


100 µl Serum Diluent

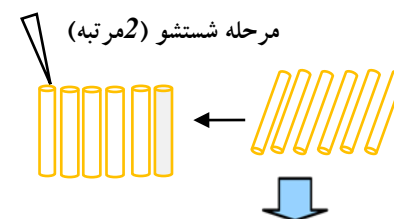


۳ از **100 µl Serum Diluent** را به تمام لوله ها به غیر لوله توتال اضافه می کنیم.

۴ حبابگیری : لوله ها را به آرامی به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده تا محتویات به خوبی مخلوط شوند و سپس لوله ها را به مدت **30 دقیقه** در حرارت اتاق بر روی شیکر **rpm300** انکوبه نمایید.



30 دقیقه بر روی شیکر **300 RPM**



مرحله شستشو (2 مرتبه)

۵ ابتدا محتویات لوله تخلیه و سپس شستشو با حجم **2cc آب مقطر** در 2 نوبت به غیر از لوله توتال انجام می شود.

تخلیه محتویات لوله