

**کیت اندازه‌گیری سریع هورمون  $\beta$ -hCG**
**Rapid hCG ELISA Kit**  
 96 Tests Cat. No: 1424-96  
 192 Tests Cat. No: 2324-192  
 Rev: A3 (1402/09/22)

**مقدمه:**

هورمون گنادوتروپین جفتی انسان (hCG) یک هورمون گلیکوپروتئینی است که سطح آن در دوران بارداری در خون و ادرار افزایش می‌یابد. ترشح این هورمون از سلول‌های تروفوبلاست ابتدایی و تقریباً هم‌زمان با لانه‌گزینی جنین شروع می‌شود و سپس توسط جفت ادامه می‌یابد. وظیفه hCG محافظت از جسم زرد جهت ترشح پروژسترون در هفته‌های اول بارداری است. این هورمون همچنین توسط تومورهای تروفوبلاستیک و غیرتروفوبلاستیک نیز تولید می‌شود. میزان hCG در بارداری‌های دو یا چند قلو، به دلیل افزایش توده جفت، نسبت به حاملگی‌های نرمال تک قلو، بالاتر است. در مواردی که توده جفت به مقدار کافی وجود نداشته باشد، مقدار hCG نسبت به حاملگی‌های نرمال پایین‌تر است که می‌تواند با خطر سقط جنین یا حاملگی خارج رحمی مرتبط باشد. حیطة کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی سطح hCG در نمونه سرم انسان به روش الایزا است.

**اصول آزمایش:**

این آزمایش براساس الایزای ساندویچ طراحی شده است. نمونه‌ها، کالیبراتورها و کنترل به چاهک‌ها حاوی آنتی‌بادی ضد hCG تثبیت شده اضافه می‌شوند. پس از شستشو چاهک‌ها hCG کونژوگه شده با آنزیم HRP در چاهک‌ها ریخته می‌شود. پس از به تعادل رسیدن واکنش و شستشوی مجدد چاهک‌ها، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌گردد که بیشترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد. مقدار رنگ ایجاد شده و در نتیجه شدت جذب نوری با غلظت hCG سرم، ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت hCG سرم به کمک منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

**محتویات کیت:**

محتویات کیت	کیت ۹۶ تستی	کیت ۱۹۲ تستی
میکروپلیت حاوی آنتی‌بادی تثبیت شده	یک عدد	دو عدد
کالیبراتورها (hCG Cal A-G): هفت ویال با غلظت‌های ۰.۲۵، ۱.۰، ۵.۰، ۲۵.۰، ۱۰۰.۰، ۲۵۰.۰ و ۵۰۰.۰ mIU/mL تهیه شده از سرم انسان	یک سری ویال با غلظت‌های متفاوت	یک سری ویال با غلظت‌های متفاوت
محلول کونژوگه آنزیمی (hCG Enzyme Conjugate)	یک عدد ویال ۶ میلی‌لیتری	یک عدد ویال ۱۲ میلی‌لیتری
محلول رقیق کننده نمونه (10X) (Sample Diluent-10X)	یک عدد ویال ۱۰ میلی‌لیتری	یک عدد ویال ۱۰ میلی‌لیتری
محلول شستشو (20X) (Wash Solution-20X)	یک عدد ویال ۵۰ میلی‌لیتری	یک عدد ویال ۵۰ میلی‌لیتری
محلول رنگزا A (Substrate Solution A)	یک عدد ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	یک عدد ویال ۶/۵ میلی‌لیتری
محلول رنگزا B (Substrate Solution B)	یک عدد ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	یک عدد ویال ۶/۵ میلی‌لیتری
محلول متوقف کننده واکنش (Stop Solution)	یک عدد ویال ۱۲ میلی‌لیتری	یک عدد ویال ۱۲ میلی‌لیتری
محلول کنترل (hCG Control)	ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری	ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری
برچسب مخصوص پلیت	یک ورق	دو ورق

توجه ۱: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است. توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در COA درج شده است.

**مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند:**

- دستگاه خوانش گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
- سمپلر کالیبره.
- آب مقطر دیونیزه.

**احتیاط در استفاده از کیت:**

- محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا سری‌های ساخت دیگر جداً خودداری کنید.
- کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.
- توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.

۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBS Ag، HIV1/2 و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شود.

۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری کنید.

۶) نمونه بیمار، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

**جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:**

۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم است و نمونه‌های پلاسما جهت انجام این تست مناسب نمی‌باشند. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.

۲) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا یک ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.

**آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:**

۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۵۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (20X) را به ۹۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید.

در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.

۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی‌لیتر از

محلول رنگزا B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

۳) آماده‌سازی محلول رقیق‌کننده نمونه: مقدار متناسب با نیاز از محلول رقیق‌کننده نمونه (10X) را به نسبت ۱:۹ با آب مقطر رقیق کنید. به‌عنوان مثال، برای ساختن ۱ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۰/۱ میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده نمونه (10X) را به ۰/۹ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کنید.

**روش انجام تست:**

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت کنید.

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک‌ها را به‌همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل‌ها را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.

۳) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص ببوشانید و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۴) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت اقدام نمایید.

۵) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

۶) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص ببوشانید و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۷) چاهک‌ها را مطابق با بند ۴ شستشو دهید.

1. <http://www.idealdiag.com/Training.aspx>






### ۸) بررسی پایداری (Stability)

**Accelerated Stability Test:** بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

**In Use Stability Test:** بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

**Shelf Stability Test:** بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد. مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

### علائم استفاده شده در برچسب کالاها

<b>EC REP</b>	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
<b>LOT</b>	Batch code
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device
<b>CE</b>	European conformity
<b>REF</b>	Catalogue number
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

### References:

- McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
  - Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
  - Tietz. Reference information for the clinical laboratory. Hn Textbook of clinical chemistry. Burtis, CA, Ashwood, RA, WB, Saunders. Philadelphia; 1999.
- در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

دفتر مرکزی: تهران - بزرگراه آشناسان - سردار جنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۸ کارخانه: کرج - کمالشهر، شهرک صنعتی بهارستان، انتهای گلستان دوم غربی، پلاک ۱۳ | تلفن: ۰۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹-۲۳

معیار پذیرش در این آزمایش،  $Bias < 10\%$  نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

NO	Sample (mIU/mL)	Added (mIU/mL)	Exp. (mIU/mL)	Obs. (mIU/mL)	% Rec
1	84.6	35.6	60.1	62	103
2	112.9	54.1	83.5	82	98
3	164.4	253.6	209	201	96

### ۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)

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

NO.	Sample (mIU/mL)	% Bias			
		1/2	1/4	1/8	1/16
1	43.2	-0.5	-2.2	1.5	-1.7
2	125.6	-2	-2.5	-0.9	-2.8
3	781.18	3.2	2.3	2.9	-1.2

### ۵) بررسی ویژگی-آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)

ویژگی این آزمایش با کمک اضافه کردن ترکیبات مندرج در جدول زیر به نمونه سرم، سنجش شد. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت غلظت ماده اضافه شده به غلظت hCG مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب ارزیابی شد. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده  $10 \pm 10\%$  درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Analyte	Cross Reactivity	Concentration
HCG	1	-
$\beta$ HCG	<0.0001	1000 ng/mL
FSH	<0.0001	1000 ng/mL
LH	<0.0001	1000 ng/mL
TSH	<0.0001	1000 ng/mL

### ۶) بررسی اثر هوک (HOOK Effect)

غلظت hCG تا  $100000$  mIU/mL بررسی گردید و اثر هوک مشاهده نشد.

### ۷) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با  $0.553$  mIU/mL تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

$$LOB = Mean_b + 1.645 SD_b$$

(s: Diluted sampl & b: Blank)

### 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 <sup>nd</sup> and 3 <sup>rd</sup> Month	30,000-100,000
2 <sup>nd</sup> Trimester	10,000-30,000
3 <sup>rd</sup> Trimester	5000-15,000 mIU/mL

### تفسیر نتایج

Negative:  $< 10$  mIU/mL

Positive:  $> 25$  mIU/mL

Border Line: **10-25** mIU/mL

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

توجه: در صورتیکه غلظت hCG در نمونه بیش از  $1000$  mIU/mL باشد نمونه باید با محلول رقیق‌کننده نمونه رقیق شود.

### پارامترهای کنترل کیفی

### ۱) بررسی دقت-آزمون دقت درون‌دور (Within Run)

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش  $CV < 10\%$  است.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean hCG (mIU/mL)	10.5	93.7	221.3
SD (mIU/mL)	0.59	4.71	9.6
CV (%)	5.6	5	4.3

### ۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین‌دور (Between Run)

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت کاری) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش  $CV < 10\%$  است.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean hCG (mIU/mL)	9.11	146.32	217.9
SD (mIU/mL)	0.56	8.25	11.54
CV (%)	6.1	5.6	5.3

### ۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

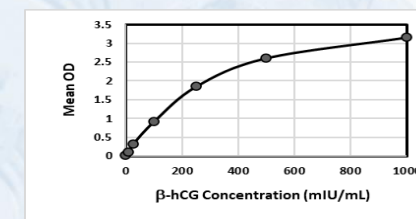
در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و سطح hCG در ترکیب به‌دست آمده اندازه‌گیری شد.

۸) حجم  $100$  میکرولیتر از محلول رنگزای آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

۹) حجم  $50$  میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

مقدار جذب نوری برای هر چاهک را در طول موج  $450$  نانومتر با استفاده از امتد Point to Point حداکثر تا  $15$  دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید. از طول موج رفرانس  $620$  تا  $630$  نانومتر استفاده کنید. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrators	Well Number	Abs	Mean Abs	Value (mIU/mL)
Cal A	A1	0.021	0.023	0
	B1	0.025		
Cal B	C1	0.120	0.116	10
	D1	0.112		
Cal C	E1	0.179	0.176	25
	F1	0.170		
Cal D	G1	0.670	0.678	100
	H1	0.686		
Cal E	A2	1.579	1.583	250
	B2	1.588		
Cal F	C2	2.602	2.608	500
	D2	2.614		
Cal G	E2	3.150	3.158	1000
	F2	3.166		



### مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای hCG

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