

کیت اندازه‌گیری هورمون β -hCG در سرم انسان
 β -hCG ELISA Kit
96 Tests: Cat. No: 0124-96
192 Tests: Cat. No: 1824-192
Rev: C3 (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 ابتدائی 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. حیثه کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی سطح hCG در نمونه سرم انسان به روش الیزا است.

اصول آزمایش:

این آزمایش براساس الیزای ساندویچ طراحی شده است. در این تست، بی‌حرکت‌سازی کمپلکس‌های ایمنی، توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهک و آنتی‌بادی مونوکلونال بیوتینیل شده ضد hCG صورت می‌گیرد. با مخلوط شدن آنتی‌بادی مونوکلونال بیوتینیل شده، آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP و سرم حاوی آنتی‌ژن، واکنش بین آنتی‌ژن موجود در سرم و آنتی‌بادی‌ها بدون هیچ رقابتی انجام می‌شود. پس از به تعادل رسیدن واکنش و شستشوی 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 استرپتاویدین تثبیت شده	یک عدد	دو عدد
کالیبراتورها (hCG Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های ۰.۱۰۰، ۰.۲۵۰، ۰.۵۰۰ و ۱.۰۰۰ mIU/mL تهیه شده از سرم انسان	یک سری ویال با غلظت‌های متفاوت	یک سری ویال با غلظت‌های متفاوت
محلول کونژوگه بیوتینی (hCG Enzyme Conjugate)	یک عدد ویال ۱۱ میلی‌لیتری	دو عدد ویال ۱۱ میلی‌لیتری
محلول کونژوگه بیوتینی (hCG Biotin Conjugate)	یک عدد ویال ۱۱ میلی‌لیتری	دو عدد ویال ۱۱ میلی‌لیتری
بافر رقیق کننده نمونه (10X) (Sample Diluent-10X)	یک عدد ویال ۱۰ میلی‌لیتری	یک عدد ویال ۱۰ میلی‌لیتری
محلول شستشو (50X) (Wash Solution-50X)	یک عدد ویال ۲۰ میلی‌لیتری	یک عدد ویال ۲۰ میلی‌لیتری
محلول رنگزا A (Substrate Solution A)	یک عدد ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	دو عدد ویال ۶/۵ میلی‌لیتری
محلول رنگزا B (Substrate Solution B)	یک عدد ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	دو عدد ویال ۶/۵ میلی‌لیتری
محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop Solution)	یک عدد ویال ۱۲ میلی‌لیتری	یک عدد ویال ۱۲ میلی‌لیتری
محلول کنترل سطح یک (hCG Control Level 1)	یک عدد ویال ۰/۵ میلی‌لیتری	یک عدد ویال ۰/۵ میلی‌لیتری
محلول کنترل سطح دو (hCG Control Level 2)	یک عدد ویال ۰/۵ میلی‌لیتری	یک عدد ویال ۰/۵ میلی‌لیتری
برچسب مخصوص پلیت	یک ورق	دو ورق

توجه ۱: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.

توجه ۲: مقادیر کنترل‌ها 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 بیماران، 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. 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.

۳) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین ($>5 \text{ mg/day}$) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.

۴) با توجه به احتمال بروز اثر هوک در صورتیکه غلظت hCG بیش از ۲۵۰ mIU/mL باشد، جهت گزارش دقیق‌تر نتیجه، باید رقیق‌سازی نمونه انجام گردد. در این صورت از محلول رقیق‌کننده نمونه آماده مصرف (به بخش آماده‌سازی معرفی‌ها توجه فرمایید) استفاده نمایید.

آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:

۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ 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 به مدت 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 ۲۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه بیوتینی به هر چاهک اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص ببوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۵ 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.

۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

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

۷) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص بیوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۸) چاهک‌ها را مطابق بند ۵ تخلیه کنید و شستشو دهید.

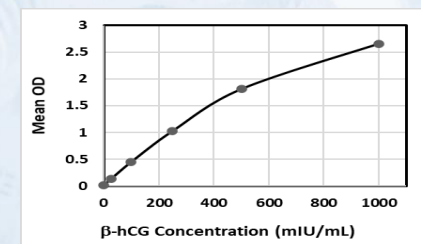
۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده شده (بخش آماده سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور، کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۱۰) حجم ۵۰ 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.

۱۱) مقدار جذب نوری برای هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از امتد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج رفرنس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (mIU/mL)
Cal. A	A1	0.017	0.018	0
	B1	0.019		
Cal. B	C1	0.125	0.128	25
	D1	0.131		
Cal. C	E1	0.449	0.452	100
	F1	0.455		
Cal. D	G1	1.012	1.028	250
	H1	1.044		
Cal. E	A2	1.799	1.811	500
	B2	1.823		
Cal. F	C2	2.641	2.658	1000
	D2	2.675		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای hCG

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

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 mIU/mL

توجه: تفسیر نتایج این کیت بر اساس اطلاعات زیر صورت می‌گیرد:

Negative: < 10 mIU/mL

Positive: > 25 mIU/mL

Border Line: 10-25 mIU/mL

برای تأیید نتیجه نمونه‌هایی که سطح hCG آنها در محدوده ۱۰ تا ۲۵ mIU/mL قرار می‌گیرد باید ۴۸ ساعت بعد مجدداً نمونه‌گیری و آزمایش تکرار 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 نوبت‌کاری (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)	76.0	146.3	217.9
S.D (mIU/mL)	4.2	7.9	11.5
C.V (%)	5.5	5.4	5.3

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

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) 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)	12.5	93.7	265.1
S.D (mIU/mL)	0.6	4.1	9.6
C.V (%)	4.8	4.4	3.6

۳) بررسی درستی - آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به اِزاه هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و سطح hCG در ترکیب به‌دست آمده اندازه‌گیری شد. 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	62.4	103.8
2	112.9	54.1	83.5	82.1	98.3
3	164.4	253.6	209.0	201.5	96.4

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	10.12	-0.5	-2.2	1.5	-1.7
2	23.18	-2	-2.5	-0.9	-2.8
3	175.9	3.2	-1.5	-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	-
β 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 ۱۰۰۰۰۰ 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 ۰/۱ mIU/mL تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645 SD_b$$

$$LOB = Mean_b + 1.645 SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

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 قرار داده شد و ارزیابی نتایج به‌صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد. مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص‌شده پایدار است.

معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

علائم استفاده شده در برچسب کالاها

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

References:

1. McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
2. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
3. 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.