

MONOKIT

کیت اندازه‌گیری هورمون β -hCG در سرم
hCG ELISA Kit
96 Tests / Cat. No: 0134-96
192 Tests / Cat. No: 1834-192
Rev: C2 (1402/09/25)

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 ندارد، 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 hCG سطح در نمونه سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این آزمایش براساس الایزای ساندویچی طراحی شده است. در این آزمایش، بی‌حرکت‌سازی کمپلکس‌های ایمنی، توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در سطح 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 مجدد چاهک‌ها، افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی را تولید می‌کند 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:

کیت ۱۹۲ تستی	کیت ۹۶ تستی	محتویات کیت
دو عدد	یک عدد	میکروپلیت حاوی استرپتاویدین تثبیت شده
یک سری ویال با غلظت‌های متفاوت	یک سری ویال با غلظت‌های متفاوت	کالیبراتورها (hCG Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های ۰.۲۵، ۰.۱۰۰، ۰.۲۵۰، ۰.۵۰۰ و ۱.۰۰۰ mIU/mL تهیه شده از سرم انسان
دو عدد ویال ۱۱ میلی‌لیتری	یک عدد ویال ۱۱ میلی‌لیتری	محلول کونژوگه آنزیمی (hCG Enzyme Conjugate)
دو عدد ویال ۱۱ میلی‌لیتری	یک عدد ویال ۱۱ میلی‌لیتری	محلول کونژوگه بیوتینی (hCG Biotin Conjugate)
یک عدد ویال ۱۰ میلی‌لیتری	یک عدد ویال ۱۰ میلی‌لیتری	بافر رقیق کننده نمونه (10X) (Sample Diluent-10X)
یک عدد ویال ۲۰ میلی‌لیتری	یک عدد ویال ۲۰ میلی‌لیتری	محلول شستشو (50X) (Wash Solution-50X)
دو عدد ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	یک عدد ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	محلول رنگزا A (Substrate Solution A)
دو عدد ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	یک عدد ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	محلول رنگزا B (Substrate Solution B)
یک عدد ویال ۱۲ میلی‌لیتری	یک عدد ویال ۱۲ میلی‌لیتری	محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop Solution)
یک عدد ویال ۰/۵ میلی‌لیتری	یک عدد ویال ۰/۵ 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)
دو ورق	یک ورق	برچسب مخصوص پلیت

توجه ۱: تمام محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است. توجه ۲: مقادیر کنترل‌ها در برگه COA درج شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند:

- دستگاه خوانش گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۲۰ (فیلتر مرجع) نانومتر.
- 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 شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری کنید.
- کلید 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 جلوگیری نمایید.

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 رقیق کننده نمونه آماده مصرف (به بخش آماده‌سازی معرف‌ها 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 بن ماری 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 از 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) محلول رقیق‌کننده نمونه: مقدار مناسب با نیاز از محلول رقیق کننده 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 نمایید.

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 به آرامی 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 بیوشانید 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.

<http://www.samantajhiz.com/Support.aspx>

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

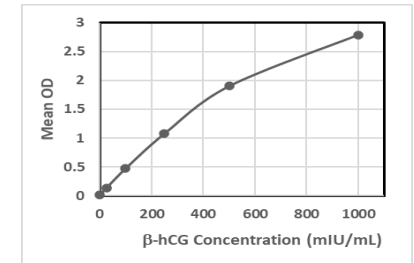
چاهکها را مطابق بند ۵ تخلیه کنید و شستشو دهید.
حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزای آماده شده (بخش آماده سازی معرفها را مطالعه بفرمایید) درون تمام چاهکها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

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

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.

مقدار جذب نوری برای هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از مدت Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج رفرانس 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	0.015	0.019	0
	B1	0.023		
Cal. B	C1	0.119	0.134	25
	D1	0.149		
Cal. C	E1	0.466	0.475	100
	F1	0.484		
Cal. D	G1	1.050	1.079	250
	H1	1.108		
Cal. E	A2	1.889	1.901	500
	B2	1.913		
Cal. F	C2	2.776	2.791	1000
	D2	2.806		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای hCG

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 تعیین گردد.

مقادیر مورد انتظار hCG در دوران حاملگی نرمال

Stage of Pregnancy	Conc. (mIU/mL)
First Week	10-30
Second Week	30-100
Third Week	100-1000
Fourth Week	1000-10000
2 nd and 3 rd Month	30000-100000
2 nd Trimester	10000-30000
3 rd Trimester	5000-15000

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 درون دور (Within Run)

دقت درون دور 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)	10.5	130.6	232.9
SD (mIU/mL)	0.5	5.4	9.2
CV (%)	4.8	4.1	3.9

۲) بررسی دقت - آزمون دقت بین دور (Between Run)

دقت بین دور 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)	11.2	58.5	356.9
SD (mIU/mL)	0.6	3.0	16.8
CV (%)	5.3	5.1	4.7

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 به دست آمده اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش، تغییر کمتر از ۱۰ درصد نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (mIU/mL)	Added (mIU/mL)	Exp. (mIU/mL)	Obs. (mIU/mL)	% Rec.
1	27.2	59.0	43.1	45.3	105.1
2	84.4	148.5	116.4	119.3	102.5
3	275.4	231.6	253.5	248.7	98.1

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)	1/2	1/4	1/8	1/16
% Bias					
1	27	-0.8	2.6	-3.2	0.1
2	96	-2.5	-2.7	2.1	-1.8
3	312	-1.8	-2.5	-2.2	-2.6

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 subunit	<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.

$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

$$LOB = Mean_b + 1.645 SD_b$$

(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 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

	Manufacturer
	Use-by date
	Batch code
	In vitro diagnostic medical device
	Own brand Labeling
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

- Swaminathan, N. and Bahl, O.P. Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 422-427 (1970).
- Bahl, O.M., Carlsen, R.B., Bellisario, R. Res. Commun. 48, 416-422 (1972).
- Bellisario, R., Carlsen, R.B. and Bahl, O.P. J. Biol. Chem. 248, 6796-6809 (1973).

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

www.samantajhiz.com

تهران - بزرگراه آشناسان - سردار جنگل شمالی - خیابان

پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۸

تلفن: ۰۲۱۸۵۵۱۸۰۰۰