

کیت اندازه گیری سریع هورمون β -hCG
Rapid hCG ELISA Kit
 96 Tests Cat. No: 1424-96
 192 Tests Cat. No: 2324-192
 Rev: B3 (1403/07/22)

مقدمه:

هورمون گنادوتروپین جفتی انسان (hCG) یک هورمون گلیکوپروتئینی است که سطح آن در دوران بارداری در خون و ادرار افزایش می یابد. ترشح این هورمون از سلول های تروفوبلاست ابتدائی و تقریباً همزمان با لانه گزینی جنین شروع می شود و سپس توسط جفت ادامه می یابد. وظیفه hCG محافظت از جسم زرد جهت ترشح پروژسترون در هفته های اول بارداری است. این هورمون همچنین توسط تومورهای تروفوبلاستیک و غیرتروفوبلاستیک نیز تولید می شود. میزان hCG در بارداری های دو یا چند قلو، به دلیل افزایش توده جفت، نسبت به حاملگی های نرمال تک قلو، بالاتر است. در مواردی که توده جفت به مقدار کافی وجود نداشته باشد، مقدار hCG نسبت به حاملگی های نرمال پایین تر است که می تواند با خطر سقط جنین یا حاملگی خارج رحمی مرتبط باشد. حیطه کاربرد این کیت اندازه گیری کمی سطح hCG در نمونه سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این آزمایش براساس الایزای ساندویچ طراحی شده است. نمونه ها، کالیبراتورها و کنترل به چاهک ها حاوی آنتی بادی ضد hCG تثبیت شده اضافه می شوند. پس از شستشو چاهک ها hCG کونژوگه شده با آنزیم HRP در چاهک ها ریخته می شود. پس از به تعادل رسیدن واکنش و شستشوی مجدد چاهک ها، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی تولید می گردد 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 می گردد.

محتویات کیت:

کیت ۱۹۲ تستی	کیت ۹۶ تستی	محتویات کیت
دو عدد	یک عدد	میکروپلیت حاوی آنتی بادی تثبیت شده
یک سری ویال با غلظت های متفاوت	یک سری ویال با غلظت های متفاوت	کالیبراتورها (hCG Cal A-G): هفت ویال با غلظت های ۰.۰۰، ۰.۰۲۵، ۰.۱۰۰، ۰.۲۵۰، ۰.۵۰۰ و ۱.۰۰۰ mIU/mL تهیه شده از سرم انسان
یک عدد ویال ۱۲ میلی لیتری	یک عدد ویال ۶ میلی لیتری	محلول کونژوگه آنزیمی (hCG Enzyme Conjugate)
یک عدد ویال ۱۰ میلی لیتری	یک عدد ویال ۱۰ میلی لیتری	محلول رقیق کننده نمونه (10X) (Sample Diluent-10X)
یک عدد ویال ۵۰ میلی لیتری	یک عدد ویال ۵۰ میلی لیتری	محلول شستشو (20X) (Wash Solution-20X)
دو عدد ویال ۶/۵ میلی لیتری	یک عدد ویال ۶/۵ میلی لیتری	محلول رنگزا A (Substrate Solution A)
دو عدد ویال ۶/۵ میلی لیتری	یک عدد ویال ۶/۵ میلی لیتری	محلول رنگزا B (Substrate Solution B)
یک عدد ویال ۱۲ میلی لیتری	یک عدد ویال ۱۲ میلی لیتری	محلول متوقف کننده واکنش (Stop Solution)
ویال (های) ۰/۵ میلی لیتری	ویال (های) ۰/۵ میلی لیتری	محلول کنترل (hCG Control)
دو ورق	یک ورق	برچسب مخصوص پلیت

توجه ۱: کلیه محلول ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده 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 نمی باشند:

- 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 کیت ها و یا سری های ساخت دیگر جداً خودداری کنید.
- کلیه محلول ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول های که تاریخ انقضاء آن ها گذشته است استفاده نکنید.
- توجه فرمایید محلول ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.

۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBS Ag، HIV1/2 و HCV بررسی شده اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری زا با استفاده از روش های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل های 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، کنترل ها، چاهک ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع آوری، آماده سازی و نگهداری نمونه:

۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم است و 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. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.

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

آماده سازی و نگهداری معرف ها:

۱) آماده سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۵۰ میلی لیتر از محلول شستشو (20X) را به ۹۵۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده سازی 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.

۲) آماده سازی محلول رنگزا: قبل از شروع استفاده از کیت، کل حجم محلول رنگزا B (ویال روشن) را داخل محلول رنگزا A (ویال تیره) خالی نمایید و برای انجام تست تا پایان مصرف کیت استفاده نمایید.

در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

۳) آماده سازی 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، ۰/۱ میلی لیتر محلول رقیق کننده نمونه (10X) را به ۰/۹ میلی لیتر آب مقطر اضافه کنید.

روش 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. کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.

۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک ها را به همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل را در چاهک های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک ها ریخته شود.

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

۴) محتویات چاهک ها را با وارونه کردن پلیت یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر 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.

به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک ها، 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) چاهک ها را با برچسب مخصوص بپوشانید و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۷) چاهک ها را مطابق با بند ۴ شستشو دهید.

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

EC	REP	Authorized representative in the European community
		Manufacturer
		Use-by date
		Batch code
		In vitro diagnostic medical device
		European conformity
		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 هر گونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

توجه: چنانچه از دستگاه‌های الایزا پروسسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.

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)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
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	-
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 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.

$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

$$LOB = \text{Mean}_b + 1.645 SD_b$$

(s: Diluted sampl & b: Blank)

۸) بررسی پایداری (Stability)

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

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

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 mIU/mL 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 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	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 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)	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)

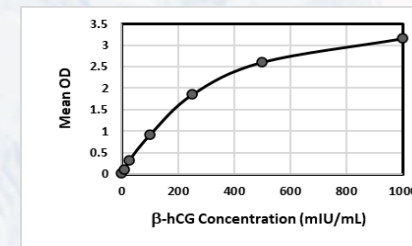
در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و سطح hCG در ترکیب به‌دست آمده اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش، $Bias < 10\%$ نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

۸) حجم ۱۰۰ 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 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.

۱۰) 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 رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان 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.