

کیت اندازه گیری هورمون β -hCG در سرم انسان
 β -hCG ELISA Kit
96 Tests: Cat. No: 0124-96
192 Tests: Cat. No: 1824-192
Rev: D4 (1404/09/08)

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 هم زمان 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. حیطة کاربرد این کیت اندازه گیری کمی سطح hCG در نمونه سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این آزمایش براساس الایزای ساندویچ ترتیبی طراحی شده است. با اضافه شدن آنتی بادی بیوتینیل و سرم حاوی آنتی ژن به چاهک، بی حرکت سازی کمپلکس های ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهک ها و آنتی بادی بیوتینیل ضد hCG صورت می گیرد. پس از شستشوی چاهک ها، آنتی بادی متصل به آنزیم HRP اضافه شده و کمپلکس های ساندویچ تشکیل می شوند. 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 شود 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 استرپتاویدین تثبیت شده
یک سری ویال با غلظت های متفاوت	یک سری ویال با غلظت های متفاوت	کالیبراتورها (hCG Cal A-F): شش ویال با غلظت های ۰.۱۰۰، ۰.۲۵۰، ۰.۵۰۰ و ۱.۰۰۰ mIU/mL تهیه شده از سرم انسان
دو عدد ویال ۱۱ میلی لیتری	یک عدد ویال ۱۱ میلی لیتری	محلول کونژوگه آنزیمی (hCG Enzyme Conjugate)
دو عدد ویال ۱۱ میلی لیتری	یک عدد ویال ۱۱ میلی لیتری	محلول کونژوگه بیوتینی (hCG Biotin Conjugate)
یک عدد ویال ۱۰ میلی لیتری	یک عدد ویال ۱۰ میلی لیتری	بافر رقیق کننده نمونه (10X) (Sample Diluent-10X)
یک عدد ویال ۲۰ میلی لیتری	یک عدد ویال ۲۰ میلی لیتری	محلول شستشو (50X) (Wash Solution-50X)
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)
یک عدد ویال ۰/۵ میلی لیتری	یک عدد ویال ۰/۵ میلی لیتری	محلول کنترل سطح یک (hCG Control Level 1)
یک عدد ویال ۰/۵ میلی لیتری	یک عدد ویال ۰/۵ میلی لیتری	محلول کنترل سطح دو (hCG Control Level 2)
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 هایی 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. 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.

۳) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین ($>5 \text{ mg/day}$) را دریافت می کنند، نمونه گیری 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 دقیق تر نتیجه، باید رقیق سازی نمونه انجام گردد. در این صورت از محلول رقیق کننده نمونه آماده مصرف (به بخش آماده سازی معرف ها توجه فرمایید) استفاده نمایید.

آماده سازی و نگهداری معرف ها:

۱) آماده سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ 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 ۲۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل در چاهک های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک ها 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) چاهک ها را با برچسب مخصوص ببوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک ها را با وارونه کردن پلیت یا آسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک ها را ۵ 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 وب سایت شرکت^۱ 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 بپوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

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

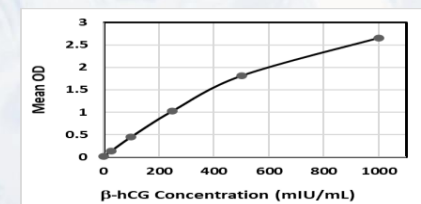
(۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده شده (بخش آماده سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. [از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.]

توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور، کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۵ 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 متد 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	0.017	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

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 mIU/mL ۱۰ تا ۲۵ 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)	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 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)	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 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.

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

$$LOD = LOB + 1.645 SD_b$$

$$LOB = Mean_b + 1.645 SD_b$$

(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:

- 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.

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