

**کیت اندازه گیری سریع هورمون  $\beta$ -hCG**
**Rapid hCG ELISA Kit**  
 96 Tests Cat. No: 1424-96  
 192 Tests Cat. No: 2324-192  
 Rev: A2 (1402/04/17)

**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 الیزا است.

**اصول آزمایش:**

این آزمایش بر اساس الیزای ساندویچ طراحی شده است. نمونه ها، کالیبراتورها و کنترل به چاهک های حاوی آنتی بادی ضد hCG تثبیت شده اضافه می شوند. پس از شستشو چاهک های 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 (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می گردد.

**محتویات کیت:**

محتویات کیت	کیت ۹۶ تستی	کیت ۱۹۲ تستی
میکروپلیت حاوی آنتی بادی تثبیت شده	یک عدد	دو عدد
کالیبراتورها (hCG Cal A-G): هفت ویال با غلظت های ۰.۲۵، ۱.۰، ۲.۵، ۱۰.۰، ۲۵.۰، ۵۰.۰ و ۱۰۰.۰ mIU/mL تهیه شده از سرم انسان	یک سری ویال با غلظت های متفاوت	یک سری ویال با غلظت های متفاوت
محلول کونژوگه آنزیمی (hCG Enzyme Conjugate)	یک عدد ویال ۶ میلی لیتری	یک عدد ویال ۱۲ میلی لیتری
محلول رقیق کننده نمونه (10X) (Sample Diluent-10X)	یک عدد ویال ۱۰ میلی لیتری	یک عدد ویال ۱۰ میلی لیتری
محلول شستشو (20X) (Wash Solution-20X)	یک عدد ویال ۵۰ میلی لیتری	یک عدد ویال ۵۰ میلی لیتری
محلول رنگزا A (Substrate Solution A)	یک عدد ویال ۶/۵ میلی لیتری	دو عدد ویال ۶/۵ میلی لیتری
محلول رنگزا B (Substrate Solution B)	یک عدد ویال ۶/۵ میلی لیتری	دو عدد ویال ۶/۵ میلی لیتری
محلول متوقف کننده واکنش (Stop Solution)	یک عدد ویال ۱۲ میلی لیتری	یک عدد ویال ۱۲ میلی لیتری
محلول کنترل (hCG Control)	ویال (های) ۰/۵ میلی لیتری	ویال (های) ۰/۵ میلی لیتری
برچسب مخصوص پلیت	یک ورق	دو ورق

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).
- سپمپر 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 انقضای کیت پایدار هستند. از محلول هایی که تاریخ انقضای آن ها گذشته است استفاده نکنید.

۳) 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: محلول های رنگزا A و B را با حجم های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی لیتر 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) 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.

توجه: چاهک اول به عنوان بلانک در نظر گرفته شود. در این چاهک نمونه، کنترل و یا کالیبراتور ریخته نشود. بقیه مراحل با سایر چاهک ها یکسان می باشد.

۳) چاهک ها را با برچسب مخصوص ببوشانید 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.

### ۷) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس (LOD) و Limit of و (Blank) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با  $0.1553 \text{ mIU/mL}$  تعیین گردید.

$$\text{LOD} = \text{LOB} + 1.645 \text{ SD}_s$$

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

(s: Diluted sampl & b: Blank)

### علائم استفاده شده در برجسب 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

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 به دست آمده اندازه گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش،  $\text{Bias} < 10\%$  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 اندازه گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش  $\text{Bias} < 10\%$  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 اندازه گیری 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  $100000 \text{ mIU/mL}$  بررسی گردید و اثر هوک مشاهده نشد.

### 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 مصرف کننده 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 <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  $10 \text{ mIU/mL}$  تا  $25 \text{ mIU/mL}$  قرار می‌گیرد باید ۴۸ ساعت بعد مجدداً نمونه‌گیری و آزمایش تکرار شود.

توجه: در صورتیکه غلظت hCG در نمونه بیش از  $1000 \text{ mIU/mL}$  باشد نمونه باید با محلول رقیق کننده نمونه رقیق 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 نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش  $\text{CV} < 10\%$  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 بین دور (Between Run)

دقت بین دور 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  $\text{CV} < 10\%$  است.

به منظور 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 برجسب مخصوص بیوشانید و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۷) چاهک‌ها را مطابق با بند ۴ شستشو دهید.

۸) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده شده (بخش آماده - سازی 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 متوقف کننده 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		

