

- جهت کاهش پدیده تأخیری، با توجه به غلظت بالای محلول آنزیم (HRP) کونزوگه شده به آنتی بادی ضد β -hCG، ضرورت دارد تعداد نمونه ها در تست حداکثر ۳ رح باشد.
- توصیه می شود در هر تست استانداردها جهت رسم منحنی استفاده شوند.
- کالیبره بودن ابزارها و دستگاهها در صحت نتایج اثر گذار است.
- جهت ساخت اجزای این کیت از مواد شیمیایی و زیستی استفاده شده است. لذا توصیه می شود هنگام کار از تماس مستقیم با مواد پرهیز شود.

محتویات کیت

اجزای تشکیل دهنده کیت ۹۶ تستی Total β -hCG Rapid به شرح زیر می باشد:

ردیف	نام اجزاء	مقدار/تعداد
۱	پلیت پوشانده شده با آنتی بادی مونوکلنال ضد β -hCG (Anti- β -hCG Antibody Coated Microtiter Plate)	1/96 wells
۲	استاندارد صفر (Standard A)	1/4 ml
۳	استانداردهای B-G (Standards B-G) کالیبراسیون بر مبنای استاندارد WHO (4 th IS 75/551)	6/1.5 ml
۴	کنترل پایین و بالا (Controls Low & High) کالیبراسیون بر مبنای استاندارد WHO (4 th IS 75/551)	2/1.5 ml
۵	محلول شستشوی غلیظ (Concentrated Wash Buffer)	1/25 ml
۶	محلول آنزیم (HRP) کونزوگه شده به آنتی بادی ضد β -hCG (Anti- β -hCG Antibody- HRP Conjugate)	1/6 ml
۷	محلول رنگ زا (TMB Substrate)	1/12 ml
۸	محلول متوقف کننده (Stop Solution)	1/12 ml

شرایط نگهداری و پایداری

- کیت را در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد نگهداری کنید.
- پایداری کیت در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد، قبل از شروع استفاده (In Shelf) و حین استفاده (In use) بر مبنای استاندارد CLSI (EP25-A) (۵) بررسی گردید که نتایج به شرح زیر می باشد:

قبل از شروع استفاده (In Shelf)	تا پایان تاریخ انقضا
حین استفاده (In use)	تا ۶ ماه

جمع آوری و آماده سازی نمونه ها

نمونه مورد نیاز جهت اندازه گیری Total β -hCG، سرم یا پلاسما می باشد. جهت پایداری نمونه ها از سدیم آزاید (Sodium Azide) استفاده نشود. نمونه ها در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد تا ۳ روز و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا یک سال قابل نگهداری هستند. (۶) از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه ها پرهیز نمایید. جهت اندازه گیری Total β -hCG نمونه های منجمد شده، ابتدا نمونه را در دمای اتاق ذوب و بعد با حرکت دست یکنواخت نمایید. در صورتی که غلظت نمونه ای بیش از آخرین استاندارد باشد، جهت اندازه گیری دقیق آنالیت، ابتدا نمونه را با "محلول استاندارد صفر" رقیق و نمونه رقیق شده را مجدد تست کنید. در محاسبه غلظت نهایی این نمونه ها، ضریب رقت را منظور نمایید.

مواد و وسایل لازم که همراه کیت عرضه نمی شوند

- دستگاه ایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر کالیبر شده
- سمپلرهای ۱۰۰، ۵۰ میکرولیتر کالیبر شده
- سرسمپلرهای یک بار مصرف
- آب مقطر برای رقیق سازی محلول شستشوی غلیظ

روش انجام تست

قبل از انجام تست:

- تمام مواد و نمونه ها را به دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد) برسانید.
- برای تهیه محلول شستشوی قابل مصرف، یک حجم محلول شستشوی غلیظ (20x) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمایید.

کاربرد

اندازه گیری غلظت Total β -hCG (intact + β -hCG) در سرم یا پلاسما انسانی به روش ایمونوآنزیماتیک (ELISA) Enzyme-linked immunosorbent assay (Cat.No. DG.Total β -hCGR.01)

مقدمه

ساختار و نقش فیزیولوژیک: گنادوتروپین جفتی انسان یا hCG (Human Chorionic Gonadotropin)، گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ۴۶۰۰۰ دالتون از دو زنجیره α و β تشکیل شده است که با پیوندهای غیرکوالانسی به هم متصلند. زنجیره α (یا α ۸۹ اسید آمینه) از لحاظ ساختمان با هورمونهای FSH (Follicle stimulating hormone)، LH (Luteinizing hormone) و TSH (Thyroid stimulating hormone) مشترک است. زنجیره β که مختص hCG بوده و مسئول خصوصیات بیولوژیکی و ایمونولوژیکی این هورمون می باشد، از ۱۸۰ اسید آمینه تشکیل شده است که ۱۵۰ اسید آمینه اول آن با LH به میزان ۸۰٪ قرابت آنتی ژنی دارد. لذا مشخصه زنجیره β ترتیب ۳۰ اسید آمینه قطعه انتهایی C-terminal می باشد که برای هر هورمون اختصاصی است. ترشح hCG توسط سلولهای تروفوبلاستی پس از لقاح سلول تخم و تکثیر اولیه آن آغاز می گردد. hCG تولید شده بر جسم زرد اثر گذاشته و از تحلیل آن جلوگیری می کند. سپس پروژسترون و استروژن های تولید شده از جسم زرد با اثر گذاری بر روی سلولهای دیواره رحم زمینه لانه گزینی و شروع حاملگی را آماده می کنند. پس از لانه گزینی و تشکیل جفت، تولید hCG توسط سلولهای جفت ادامه پیدا می کند. بدین ترتیب مهم ترین وظیفه hCG نگهداری جسم زرد است که به نوبه خود تولید کننده استرادیول و پروژسترون لازم جهت تداوم بارداری و رشد جنین است. همچنین هورمون hCG در جنین مذکر، سلولهای لیدیگ (Leydig) بیضه را که تولید کننده تستوسترون هستند تحریک و به تمایز جنسی جنین کمک می کند. (۱،۲)

کاربرد بالینی: از شروع بارداری طبیعی داخلی رحمی، غلظت سرمی hCG به تدریج افزایش می یابد و این روند صعودی در اواخر سه ماهه اول بارداری به بالاترین میزان خود می رسد سپس به طور معنی داری تا زمان زایمان کاهش می یابد. لذا استفاده اصلی تعیین غلظت هورمون hCG در تایید حاملگی می باشد. علاوه بر آن اندازه گیری این هورمون در تعیین تقریبی سن بارداری، بررسی احتمال وقوع سقط، تشخیص حاملگی خارج رحمی و مسمومیت حاملگی کاربرد دارد. بدین معنا که غلظت سرمی این هورمون در موارد فوق پایین تر از مقدار آن در بارداریهای طبیعی داخلی رحمی است. (۳) با توجه به افزایش میزان hCG در تومورهای تروفوبلاستیک و ژرمینال، تومورهای غیر تروفوبلاستیک (Embryonal carcinoma, Choriocarcinoma)، تومور های تخمدان، پستان، بیضه، مثانه، پانکراس، ریه، کبد، دستگاه گوارش و مول هیداتیدفرم (Hydatidiform mole)، اندازه گیری این هورمون در تشخیص و پیگیری پاسخ به درمان موارد پاتولوژی فوق الذکر حائز اهمیت است. (۴)

اساس روش سنجش

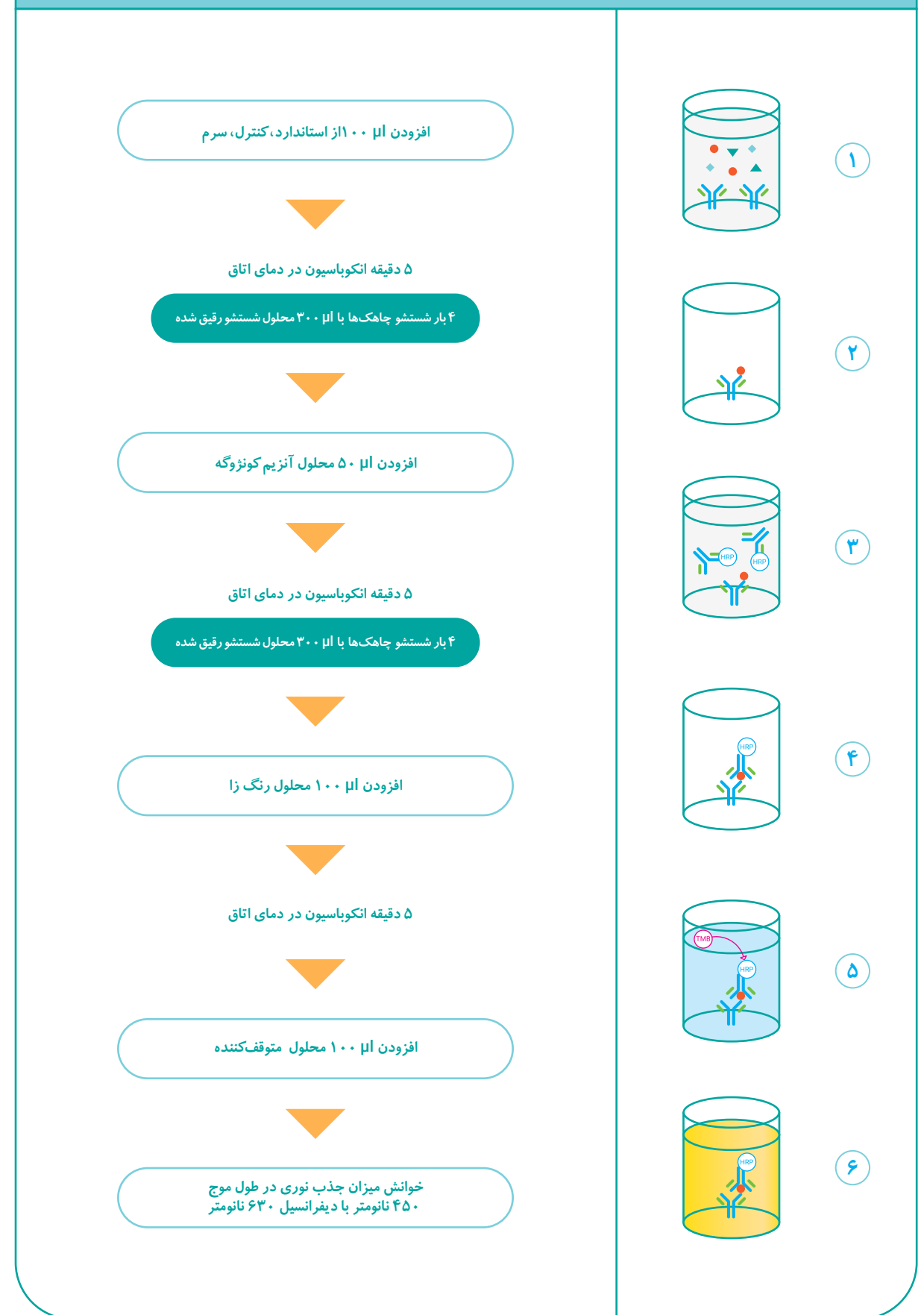
مدت زمان انجام تست: ۵ دقیقه + ۵ دقیقه + ۵ دقیقه

طراحی کیت Total β -hCG Rapid بر اساس روش ایمونوآنزیماتیک ساندویچی با استفاده از آنتی بادی های مونوکلنال می باشد. در این روش آنتی ژن مورد سنجش طی دو مرحله بین آنتی بادی تثبیت شده در ته چاهک های پلی استایرنی و آنتی بادی دوم متصل به آنزیم پراکسیداز (HRP) که شاخص های آنتی ژنیک متمایزی را روی مولکول β -hCG شناسایی می کنند، قرار می گیرد. پس از شستشو و خارج کردن آنالیت های غیر متصل با افزودن سوبسترا، تترا متیل بنزیدین (TMB)، آنزیم رنگ آبی ایجاد می کند. با اضافه نمودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می شود. شدت رنگ ایجاد شده که با غلظت β -hCG ارتباط مستقیم دارد، در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) اندازه گیری می گردد.

توجه و احتیاط

- این کیت تشخیصی به صورت *in vitro* قابل استفاده می باشد.
- کلیه محلول های کیت آماده مصرف هستند، فقط محلول شستشوی غلیظ (20x) قبل از استفاده نیاز به رقیق سازی دارد.
- اجزای اختصاصی این کیت برای مصرف با اجزای هم سری ساخت کیت ارائه شده اند.
- اجزای عمومی کیت شامل محلول های شستشو، رنگ زا و متوقف کننده می باشند که برای سایر محصولات دیازبست نیز قابل استفاده هستند.
- به منظور رقیق سازی نمونه می بایست از "محلول استاندارد صفر" کیت مربوطه، استفاده گردد.

خلاصه روش کار



۵. بازبایی: به منظور بررسی اثر ماتریکس، تست بازبایی این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP34)^(۹) انجام گردید. بدین منظور مقادیر متفاوتی از نمونه حاوی Total β-hCG با غلظت بالا (۴۰۱/۳۰ mIU/ml) به نمونه مورد بررسی حاوی Total β-hCG با غلظت پایین (۷/۷۴ mIU/ml) افزوده شد. سپس غلظت نمونه‌ها با کیت Total β-hCG اندازه‌گیری گردید و درصد ریکاوری که شاخص میزان دقت بازبایی می‌باشد، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\frac{a-b}{c} \times 100$$

- a:** غلظت اندازه‌گیری شده نمونه مورد بررسی بعد از افزودن آنالیت
b: غلظت اندازه‌گیری شده نمونه مورد بررسی بعد از افزودن محلول رقیق‌کننده
c: غلظت آنالیت افزوده شده

(درصد ریکاوری بدست آمده بین ۹۵/۹ تا ۱۰۷/۳ است)

% ریکاوری	a (mIU/ml)	b (mIU/ml)	c (mIU/ml)
۱۰۷/۳	۲۷/۰۳	۶/۵۳	۱۹/۱۰
۹۸/۷	۴۲/۶۱	۶/۶۲	۳۶/۴۸
۱۰۰/۳	۷۳/۹۶	۶/۶۸	۶۶/۸۸
۹۵/۹	۱۱۵/۶۲	۵/۶۷	۱۱۴/۶۵

منابع

- Cole L.A. Human chorionic gonadotropin (hCG) and hyperglycosylated hCG seven semi-independent critical molecules: A review. J Mol Oncol Res. 1(1) 2017.
- Cole L.A. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. Reproductive Biology and Endocrinology. 8, 2010.
- Theofanakis C., et al. Human chorionic gonadotropin: The pregnancy hormone and more. Int. J. Mol. Sci. 18, 2017.
- Stenman U. Human chorionic gonadotropin in cancer. Clinical biochemistry. 37 (7), 2004.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Stability of In Vitro Diagnostic Reagents; Approved Guideline – First Edition. NCCLS Document EP25-A. 2009.
- Guder WG, et al. List of Analytes; Preanalytical Variables. Brochure in: Samples: From the Patient to the Laboratory. GIT-Verlag, Darmstadt, 16 1996.
- Burtis C.A, et al. Tietz fundamental of clinical chemistry and molecular diagnostics. 7th edition, 2013.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline – Second Edition. NCCLS Document EP5-A2. 2004.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Establishing and Verifying an Extended Measuring Interval Through Specimen Dilution and Spiking – First Edition. EP34. 2018.

محدوده غلظت (mIU/ml)	هفته بعد از باروری	هفته بعد از LMP (Last menstrual period)
۵-۱۰۰	۲	۴
۲۰۰-۳۰۰	۳	۵
۱۰۰۰-۸۰۰۰	۴	۶
۹۰۰۰-۵۰۰۰۰	۵-۱۲	۷-۱۴
۵۰۰۰-۸۰۰۰۰	۱۳-۲۴	۱۵-۲۶
۳۰۰۰-۱۵۰۰۰	۲۶-۳۸	۲۷-۴۰

قابل ذکر است که جدول فوق یک راهنمای کلی است و توصیه می‌گردد هر آزمایشگاه با اندازه‌گیری غلظت Total β-hCG افراد سالم و باردار، مقادیر طبیعی مرجع خود را تعیین و از آن برای تفسیر نتایج استفاده نماید.

ویژگی‌های اختصاصی کیت

- حساسیت:** حداقل غلظت قابل اندازه‌گیری Total β-hCG که از نمونه فاقد آنالیت قابل تمایز باشد را حساسیت گویند. این مقدار که بر اساس میانگین غلظت استاندارد صفر بعلاوه دو برابر انحراف معیار محاسبه گردیده است (بدست آمده از ۱۰ تست)، ۰/۵ mIU/ml می‌باشد.
- صحت:** غلظت Total β-hCG ۱۹۲ نمونه تصادفی با کیت دیازست و روش مرجع (ELFA) اندازه‌گیری شد. نتایج بدست آمده از مقایسه دو روش ضریب همبستگی خطی ۰/۹۹۹ را نشان می‌دهد. غلظت نمونه‌ها با کیت دیازست بین ۰/۵۱ mIU/ml تا ۹۸۲/۸۷ و با روش مرجع ۰/۵۲ mIU/ml تا ۹۰۹/۵۶ بود. نتایج مقایسه دو روش به شرح زیر است:

Slope	Intercept	غلظت نمونه‌ها (mIU/ml)	تعداد نمونه	روش
۱/۰۰۰	-۰/۰۵۱	۰/۵-۱۰۰۰	۱۹۲	Passing/Bablok
۰/۹۶۸	۱/۵۴۴	۰/۵-۱۰۰۰	۱۹۲	Linear Regression

- دقت:** شاخص دقت این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP5-A2)^(۸) ارزیابی گردیده است. بدین منظور میزان Total β-hCG ۳ نمونه با غلظت‌های مختلف اندازه‌گیری و انحراف معیار و ضریب تغییرات محاسبه گردید که در جدول زیر آمده است:

شماره نمونه	تعداد سنجش	میانگین غلظت (mIU/ml)	Within Run		Total	
			SD	%CV	SD	%CV
۱	۶۰	۲۰/۵۷	۱/۱۳	۵/۵۲	۱/۳۷	۶/۶۵
۲	۶۰	۱۷۳/۵۲	۸/۷۶	۵/۰۵	۱۰/۲۲	۵/۸۹
۳	۶۰	۳۶۶/۴۲	۱۴/۷۱	۴/۰۳	۱۶/۹۸	۴/۶۳

- خطی بودن:** به منظور بررسی صحت اندازه‌گیری نمونه‌های با غلظت بالای ULQo (upper limit of quantitation) تست خطی بودن این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP34)^(۹) انجام گردید. بدین منظور نمونه سرم با غلظت ۴۴۰/۵۱ mIU/ml با "نمونه فاقد آنالیت" به صورت متوالی رقیق شد سپس غلظت‌ها با کیت Total β-hCG اندازه‌گیری گردید. درصد ریکاوری رقت که شاخص میزان دقت رقت‌گیری می‌باشد، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\frac{\text{غلظت اندازه‌گیری شده (mIU/ml)}}{\text{غلظت مورد انتظار (mIU/ml)}} \times 100$$

(محدوده درصد ریکاوری بدست آمده بین ۹۵/۰ تا ۱۰۴/۷ است)

% ریکاوری	غلظت اندازه‌گیری شده (mIU/ml)	غلظت مورد انتظار (mIU/ml)	رقت
۱۰۴/۷	۲۳۰/۵۶	۲۲۰/۲۵	۱:۲
۹۶/۳	۱۰۶/۰۷	۱۱۰/۱۲	۱:۴
۱۰۲/۷	۵۶/۵۷	۵۵/۰۶	۱:۸
۹۵/۰	۲۶/۱۲	۲۷/۵۳	۱:۱۶

کنترل کیفی

تست در صورتی تأیید می‌گردد که:

- جذب نوری استاندارد صفر کمتر از ۰/۰۹ باشد.
- جذب نوری استاندارد آخر بیش از ۱/۴ باشد.
- خوانش کنترل‌های پایین و بالای کیت در محدوده مورد قبول باشد.
- توصیه می‌گردد جهت حصول اطمینان از نتایج کیت، علاوه بر کنترل‌های ارائه شده در کیت، به صورت دوره‌ای از کنترل‌های دقت و صحت تجاری نیز استفاده گردد. بدیهی است نتایج بدست آمده بایستی در محدوده مورد قبول قرائت گردد.

تداخل‌ها و محدودیت‌ها

- جهت بررسی اختصاصیت آنتی بادی به کار رفته در این کیت، اثر تداخلی آنالیت‌های هورمونی TSH (تا ۱۰۰۰ μIU/ml)، LH (تا ۲۰۰ mIU/ml) و FSH (تا ۲۰۰ mIU/ml) بررسی گردید. نتایج در جدول زیر آمده است.

ماده افزوده شده	درصد تداخل (Cross-reactivity)
TSH	<۰/۱
LH	<۰/۱
FSH	<۰/۱

- اثر تداخلی بیلی روبین (تا ۲۰ mg/dl)، هموگلوبین (تا ۵۰۰ mg/dl)، تری گلیسیرید (تا ۳۰۰ mg/dl) و فاکتورهای روماتوئید (تا ۳۴۰۰ IU/ml) در سرم کمتر از ۵٪ می‌باشد.
- در این کیت برای نمونه‌های رقیق نشده تا غلظت (تا ۵۰۰۰۰ mIU/ml) اثر هوک دیده نشد.
- نمونه سرم یا پلاسمای افرادی که سابقه درمان یا تشخیص بیماری با مواد حاوی آنتی‌بادی مونوکلنل موش داشته‌اند، می‌تواند حاوی آنتی بادی‌های انسانی ضد موش (HAMA) باشد. با توجه به غلظت آنتی‌بادی و مواد بازدارنده مورد استفاده در این کیت، واکنش‌های تداخلی غیر اختصاصی به حداقل رسیده و تا کنون واکنش مثبت کاذب مشاهده نشده است.
- در موارد نادری به دلیل پیدایش ایزوفرم‌های جدید β-hCG در سرم بیمار، غلظت بدست آمده از روش‌های مختلف لزوماً بر هم منطبق نیستند. لذا ضروری است آزمایشگاه ضمن اعلام روش سنجش بکار رفته در تعیین غلظت Total β-hCG به پزشک، در صورت تغییر آن تطابق عددی دو روش را پیش از تغییر، برای بیماران تعیین نماید.
- محدوده قابل اندازه‌گیری غلظت Total β-hCG Rapid با این کیت، ۰/۵-۱۰۰۰ mIU/ml می‌باشد.

مقادیر طبیعی

از بررسی غلظت Total β-hCG، ۲۸۸ نمونه افراد سالم (مردان و زنان غیر حامله) نتایج زیر بدست آمده است.

جنسیت	تعداد	95% Interval (mIU/ml)	میانگین (mIU/ml)
مردان	۱۱۶	<۴/۶	۰/۷
زنان	۱۷۲	<۵/۳	۱/۲

در افراد سالم غیر حامله، غلظت سرمی hCG معمولاً کمتر از ۵ mIU/ml است. در بارداری طبیعی داخل رحمی، ۱-۱/۵ هفته بعد از لقاح غلظت hCG قابل اندازه‌گیری و حدود ۵ mIU/ml می‌باشد. غلظت این هورمون در طول ۶ هفته اول حاملگی هر ۱/۵-۳ روز دو برابر می‌شود. در اواخر سه ماهه اول حاملگی، غلظت hCG به بالاترین میزان خود (حدود ۱۰۰۰۰۰ mIU/ml) می‌رسد سپس از اوایل سه ماهه دوم حاملگی میزان آن به آرامی کاهش می‌یابد. لازم به یادآوری است که غلظت این هورمون در موارد حاملگی‌های دوقلو یا چند قلو تقریباً دو برابر می‌باشد. در حاملگی خارج رحمی غلظت این هورمون نسبت به حاملگی طبیعی داخل رحمی پایین تر می‌باشد. نمونه‌های با غلظت Total β-hCG در محدوده ۵-۱۰ mIU/ml مشکوک به حاملگی تلقی شده و تکرار تست بعد از ۴۸ ساعت توصیه می‌گردد. در حاملگی‌های طبیعی داخل رحمی، میزان Total β-hCG گزارش شده در کتب مرجع^(۷) به شرح ذیل است:

مراحل انجام تست:

- ۱۰۰۰ میکرولیتر از هر استاندارد، کنترل و نمونه سرم به چاهک مربوطه بریزید. (حداکثر ۳ رج)
- روی چاهک‌ها را با برجسب مخصوص پوشانده و مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
- چاهک‌ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.
- به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول آنزیم کونزوگه اضافه نمایید.
- روی چاهک‌ها را با برجسب مخصوص پوشانده و مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
- چاهک‌ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.
- به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگ را اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
- به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده اضافه نمایید و بعد از مخلوط کردن به مدت ۱۵ ثانیه، میزان جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر، حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، بخوانید.

محاسبه نتایج

غلظت Total β-hCG نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد (رسم به صورت دستی یا دستگاه الیزا ریدر) تعیین می‌گردد. در این منحنی جذب نوری استانداردها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر بر روی محور عمودی (Y) و غلظت آن‌ها را بر حسب mIU/ml بر روی محور افقی (X) مشخص کنید و بر اساس آن منحنی را رسم نمایید. با استفاده از منحنی ترسیم شده و جذب نوری بدست آمده از نمونه، غلظت Total β-hCG آن قابل محاسبه می‌باشد. جدول و نمودار زیر به عنوان مثال ارائه شده است.

نمونه	جذب نوری	غلظت Total β-hCG (mIU/ml)
استاندارد A	۰/۰۲۲	۰
استاندارد B	۰/۱۲۹	۱۰
استاندارد C	۰/۵۲۱	۵۰
استاندارد D	۰/۸۴۷	۱۰۰
استاندارد E	۱/۶۰۳	۲۵۰
استاندارد F	۲/۳۱۸	۵۰۰
استاندارد G	۲/۹۵۷	۱۰۰۰
کنترل پایین	۰/۱۳۳	۱۰/۳۷
کنترل بالا	۱/۶۳۱	۲۶۱/۴۹
سرم	۱/۳۹۴	۲۰۰/۱۸

