IVD-REF: PS – HCG.T	پیشگام‌آمان سنجش پیشگام در سنجش و نوآوری	کیت الایزا HCG- Titration
Ver. No: 04		HCG- Titration ELISA KIT

معرف	۴۸ تستی	۹۶ تستی	آماده سازی
پلیت پوشیده شده با استرپتاویدین	1×48 wells	1×96 wells	آماده مصرف
استاندارد صفر(بافر عاری از آنالیت، سازگار با سرم انسانی همراه با نگهدارنده)	1 ×5.0 mL	1 ×5.0 mL	آماده مصرف
کالیبراتور ۲-۶ (IU/L ۲۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰) در بافر، به همراه نگهدارنده کالیبره شده علیه ماده مرجع 3rd ISO WHO 75/539	5 ×0.5 mL	5 ×0.5 mL	آماده مصرف
نمونه کنترل در بافر سازگار با سرم انسانی همراه با نگهدارنده(بازه قابل قبول سرم کنترل برروی برچسب قید شده است)	1 ×0.5 mL	1 ×0.5 mL	آماده مصرف
بافر سنجش **Assay Buffer** (سبز رنگ)	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف
کونژوگه(قرمز رنگ)	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول شستشو غلیظ	1 ×30 mL	1 ×30 mL	به نسبت ۱ به ۲۰ با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید
محلول سوبسترا-رنگ زا (تترامتیل بنزیدین و آب اکسیژنه)	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول توقف (اسید کلریدریک ۱ مولار)	1 ×6.0 mL	1 ×6.0 mL	آماده مصرف

کاربرد:

کیت **HCG Titration ELISA Kit** شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس برای اندازه گیری کمی هورمون گونادوتروپین جفتی انسانی یا**Human chorionic gonadotropin** فرم کامل **(Intact hCG)** در سرم یا پلاسما طراحی گردیده است.

مقدمه :

همانند **LH،FSH و TSH** گونادوتروپین جفتی انسانی نیز به خانواده گونادوتروپین ها تعلق داشته و از دو زیر واحد آلفا و بتا تشکیل شده که در هورمون کامل (**Intact hCG**) به یکدیگر متصل هستند. زنجیره آلفا در هر چهار هورمون گلیکوپروتئینی یکسان است و زنجیره بتا ساختار تا حدود زیادی متفاوتی در این چهار هورمون داشته و مسئول اعمال هورمونی اختصاصی هر یک از آنها می باشد.

گونادوتروپین جفتی انسانی که توسط جفت در هنگام حاملگی تولید می شود، متشکل از تعدادی ایزوهورمون با اندازه های مولکولی متفاوت است. عملکرد بیولوژیک **hCG** حفظ جسم زرد یا **Corpus Luteum** طی حاملگی می باشد. همچنین برروی تولید استروئیدها اثر می گذارد. سرم زن باردار تقریباً حاوی هورمون کامل است.

اندازه گیری غلظت **hCG** امکان تشخیص حاملگی را درست یک هفته بعد از لقاح فراهم می آورد. تعیین مقدار **hCG** در سه ماهه اول حاملگی از اهمیت بالایی برخوردار است. افزایش مقدار **hCG** بر وجود مول هیداتیدیفرم و حاملگی چندقلویی دلالت دارد. کاهش مقدار این هورمون می تواند نشانه ای از سقط تشخیص داده نشده، حاملگی خارج رحمی یا مرگ داخل رحمی جنین باشد. افزایش مقدار **hCG** در غیاب حاملگی بر وجود تومور دلالت می کند.

آنتی بادی های مونوکلونالی که در کیت **hCG** شرکت پیشگامان مورد استفاده قرار گرفته اند، توانایی شناسایی فرم کامل **hCG** را دارند، لذا این کیت باید در تشخیص و پایش حاملگی مورداستفاده قرار گیرد.

اساس آزمایش :

کیت سنجش **hCG-Titration** شرکت تولیدی-تحقیقاتی پیشگامان سنجش ایساتیس برمبنای اصول الایزا نوع ساندویچی عمل می کند. در این کیت از فن آوری استرپتاویدین در پوشاندن فاز جامد استفاده شده است. به طور خلاصه استاندارد یا کنترل یا نمونه بیمار هم زمان با بافر سنجش که حاوی آنتی بادی بیوتینیله علیه مولکول کامل**hCG** می باشد به چاهک اضافه می شود. آنتی بادی هم زمان به **hCG** و از ناحیه بیوتین به استرپتاویدین کف چاهک متصل می شود. بعد از یک مرحله شستشو، کونژوگه متصل به آنزیم **HRP** که نسبت به آنتی بادی بیوتینیله،**hCG** را از ناحیه متفاوتی شناسایی می کند به چاهک اضافه می شود. **hCG** موجود در

استاندارد/کنترل/ نمونه بیمار بین دو آنتی بادی به حالت ساندویچ در آمده و مجموعه از طریق بیوتین به استرپتاویدین فازجامد متصل می باشد. سپس اجزای اتصال نایافته طی شستشو از محیط خارج و با افزودن محلول سوبسترا - رنگزا و انکوباسیون به مدت ۱۰ دقیقه رنگ آبی بوجود می آید. با افزودن محلول توقف تولید رنگ متوقف می گردد که شدت جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری می شود. شدت رنگ با مقدار **hCG** موجود در سرم نسبت مستقیم دارد .

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

۱. سمپلرهای ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری دقیق. سمپلر ۸ کاناله با قابلیت پیپتینگ ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر و یا دیسپنسر اتوماتیک، اگرچه ضروری نیست ولی باعث بهبود قابل توجه تکرارپذیری و صحت نتایج می گردد.

۱. آب مقطر با هدایت کمتر از **1 µS/cm**

۲. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.

۳. کاغذ رطوبت گیر

۴. دستگاه واشر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر ۸ کاناله یا سرنگ که قادر به ریختن ۳۵۰ میکرولیتر محلول شستشو باشد.

نگهداری کیت :

۱. کیت پس از تحویل باید در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد (یخچال) نگهداری شود. کلیه معرف ها و اجزاء کیت تا تاریخ انقضاء مندرج برروی جعبه کیت به شرط نگهداری در دمای یادشده پایدار هستند. ***هرگز فراتر از تاریخ انقضاء مندرج برروی جعبه از کیت استفاده نکنید.***

۲. غلظت کالیبراتورها و نیز دامنه قابل قبول نمونه های کنترل بر روی ویال درج شده است و ممکن است بین شناسه های مختلف ساخت تفاوت داشته باشد.

۳. از انجماد کیت یا اجزاء کیت خودداری نمایید.

۴. میکروپلیت باید در کیسه در بسته به همراه رطوبت گیر نگهداری شود. در هنگام استفاده پس از رسیدن دمای کیسه میکروپلیت به دمای اتاق، تعداد لازم استریپ را از کیسه آلومینیومی خارج و مابقی همراه رطوبت گیر بلافاصله به کیسه منتقل و درب کیسه با دقت بسته و به یخچال منتقل گردد.

۵. محلول شستشو باید روزانه و تازه تهیه شود و در همان روز تهیه مصرف شود.

۶. تغییر در خصوصیات فیزیکی معرف ها نظیر وجود ذرات معلق در آنها اغلب حاکی از آلودگی و خرابی معرف ها می باشد.

۷. محلول سوبسترا-رنگ زا باید بی رنگ باشد. وجود رنگ آبی در این محلول نشان از خرابی و آلودگی آن دارد و باید دور ریخته شود.

۸. کیت های باز شده اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شوند، حداکثر به مدت ۸ هفته پایدار خواهند بود.

۹. اجزاء کیت ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابه جایی درب معرف ها جلوگیری شود.

۱۰. استفاده از سر سمپلر یکبار مصرف برای دقت و صحت و پرهیز از آلودگی برای برداشتن نمونه ها استانداردها و کنترل ها ضروری است.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

۱. سرم یا پلاسمای **EDTA** نمونه مناسب برای این آزمایش است.

۲. از نمونه های با کدورت بالا، همولیز یا لیپمیک ترجیحاً استفاده نشود.

۳. در صورتی که انجام آزمایش در همان روز جمع آوری نمونه امکان پذیر نباشد، نمونه ها را می توان برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگه داری کرد. برای مدت طولانی تر نمونه ها باید در **-۲۰°C** سانتیگراد نگهداری شود.

۴. از ذوب و انجماد مکرر نمونه ها اجتناب شود. نمونه های منجمد باید قبل از آزمایش به آرامی، اما به طور کامل مخلوط شده تا کاملاً یکنواخت و همگن گردد.

احتیاطات و هشدارها

۱. کیت فقط برای تشخیص آزمایشگاهی کاربرد دارد.

۲. کلیه معرف های کیت برای سنجش مستقیم **hCG** سرم یا پلاسمای **EDTA** استاندارد شده اند و برای سنجش **hCG** ادرار یا سایر مایعات بیولوژیک یا پلاسمای غیر **EDTA** مناسب نمی باشد.

۳. قبل از آغاز سنجش، دستورالعمل پیش رو را به دقت مطالعه نموده و اطمینان حاصل کنید که تمامی نکات آن را به خوبی فرا گرفته اید. همواره از ویرایش معتبر و به روز دستورالعمل که همراه کیت بسته بندی شده است، استفاده کنید

۴. کلیه جوانب ایمنی دراجرای آزمایش رعایت شود. برای آگاهی از احتیاطات لازم به "راهنمای اصول کلی حفاظت و پیشگیری از آلودگی کارکنان و محیط آزمایشگاه (روش های صحیح میکروب شناسی و تکنیک های صحیح

آزمایشگاهی)" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش ۱۳۹۳ مراجعه نمایید.

۵. از تماس تمام معرف ها به ویژه محلول توقف که حاوی اسید کلریدریک است با پوست جلوگیری شود. در صورت تماس با آب و صابون شستشو داده شود.

۶. در این کیت برای ساخت برخی از اجزا از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر آنتی بادی علیه **HIV-1 and 2** و **HCV** و آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت **B** (**HBsAg**)، منفی گزارش شده اند، ولی از آنجایی که هیچ آزمایشی نمی تواند به طورکامل ایمنی یک نمونه با منشاء انسانی را تضمین نماید، با آن همانند یک نمونه بالقوه عفونی رفتار نمایید.

۷. با کلیه نمونه های بیمار به عنوان نمونه های بالقوه عفونی برخورد نمایید.

۸. برخی از معرف ها حاوی سدیم آزاید به عنوان نگهدارنده می باشند. سدیم آزاید ممکن است با سرب و مس موجود در لوله کشی آب شهری واکنش داده و تولید آزایدهای فلزی قابل انفجار کند. جهت آگاهی از نحوه وارهایی پس ماندهای آزمایشگاهی به "دستورالعمل نحوه مدیریت پسماندهای آزمایشگاهی" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش ۱۳۹۴ مراجعه نمایید.

آماده سازی معرف ها:

۱. همه معرف ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (۲۷-۲۰ درجه سانتیگراد) برسند.

۲. تهیه محلول شستشو: برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ **(20X)** را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمائید.

نکات مهم در انجام تست:

۱. فرایند شستشو از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. شستشوی ناکافی باعث عدم جداشدن پیوندهای غیراختصاصی و جذب نوری زمینه (**Background**) می گردد.

۲. کیفیت آب مقطر مصرفی در کیفیت محلول شستشو و جدا کردن پیوندهای غیراختصاصی اهمیت زیادی دارد.

۳. در مواردی که مقدار**hCG** نمونه بیش از **1000µIU/mL** باشد، نمونه را با استاندارد صفر رقیق و سپس آزمایش را تکرار نموده و ضریب رقت را در محاسبه نهایی منظور نمایید.

۴. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.

۵. دمای مطلوب محیط آزمایشگاه برای آزمایش های الایزا ۲۰ تا ۲۷ درجه سانتیگراد می باشد.

۶. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش به خوبی مخلوط نمایید.

۷. بهتراست استانداردها، کنترل ها و نمونه ها را به صورت دوتایی (**Duplicate**) و ترجیحاً در دو چاهک عمودی آزمایش کنید و میانگین جذب نوری دو چاهک جهت محاسبه نتایج مورداستفاده قرار گیرد.

۸. جهت پیپت کردن محلول سوبسترا-رنگ زا و محلول توقف از میکروپیپت های حاوی ***قطعات فلزی استفاده نکنید***.

۹. زمان های انکوباسیون و دمای انکوباسیون را با دقت رعایت کنید.

۱۰. در کیت hCG-Titration شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس به دلیل استفاده از استرپتاویدین برای پوشاندن کف چاهک، تا زمان افزودن کونژوگه عملاً واکنشی در چاهک رخ نمی دهد، بنابراین جز خطای ناشی از تبخیر نمونه (در صورتی که ریختن استانداردها، کنترل ها و نمونه ها بیش از ۵ دقیقه به طول بیانجامد) خطای قابل توجهی از ناحیه اختلاف زمانی بین ریختن اولین نمونه و آخرین نمونه رخ نمی دهد. با این وجود پیپتینگ چاهک ها با محلول کونژوگه نباید بیشتر از ۲-۳ دقیقه به طول بیانجامد، لذا توصیه می شود اگر کل پلیت هم زمان ران می شود، برای پرهیز از خطای ناشی از اختلاف زمانی (Drift)، از تجهیزاتی نظیر دیسپنسر اتوماتیک یا سمپلر هشت کاناله برای ریختن معرف ها استفاده شود یا بیش از شش استریپ در هر بار ران نشود.

۱۱. در هر بار انجام آزمایش منحنی کالیبراسیون را مجدد ترسیم نموده و برای محاسبه نتایج از منحنی ذخیره شده استفاده نکنید.

۱۲. مراحل آزمایش را بدون وقفه انجام دهید. وقفه بین مراحل باعث نتایج کاذب می گردد.

۱۳. در کلیه مراحل انجام آزمایش و متعاقب هر مرحله پیپتینگ، چاهک ها از نظر وجود حباب بررسی شوند. در صورت وجود حباب با ضربه آهسته به پلیت از محیط خارج شوند.

۱۴. هر نوع نمونه یا ماده کنترلی که حاوی سدیم آزاید یا تیومرسال باشد، با این کیت سازگار نبوده و آزمایش برروی آنها ممکن است به حصول پاسخ های کاذب بیانجامد

روش انجام آزمایش:

۱- تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده نمگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.

۲- ۲۵ میکرولیتر از استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار به داخل هر چاهک بریزید.

۳- ۱۰۰ میکرولیتر از بافر سنجش، به تمام چاهک ها اضافه کنید.

۴- پلیت را به مدت ۱۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها به خوبی مخلوط شوند. سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آن را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق (**۲۵°C-۲۰**) انکوبه کنید.

۵- محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را طبق دستورالعمل زیر شستشو دهید:

- برای شستشوی چاهک ها، ابتدا ۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک ها را وارونه کرده و همراه با تکان دادن خالی کنید و عمل شستشو را چهار بار دیگر (جمعاً به مدت ۵ بار) تکرار کنید. در انتهای شستشو، با ضربه زدن ملایم پلیت بر روی کاغذ جاذب الرطوبه تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.
- بهتر است برای شستشو از دستگاه های اتوماتیک واشر که قابل برنامه ریزی است استفاده نمایید. که در این صورت به دستورالعمل دستگاه شستشو مراجعه نمایید.

۶- ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی ، به تمام چاهک ها اضافه کنید، درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق (**۲۵°C-۲۰**) انکوبه کنید.

۷- طبق دستورالعمل مرحله ۵ چاهک ها را شستشو دهید.

۸- ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترا-رنگ زا آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

50-9 میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همان ترتیبی که محلول سوبسترا-رنگ زا را اضافه نمودید، به همه چاهک ها اضافه کنید. سپس حداکثر ظرف مدت ۱۰ دقیقه جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول موج ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر مرجع استفاده کنید).

محاسبه نتایج:

۱. با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها برروی محور عمودی (محور **Y**) و غلظت مشخص آنها برروی محور افقی (محور **X**) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد را از طریق ترسیم خطوطی که از که از تمامی نقاط تلاقی عبور کرده باشد، ترسیم کنید.

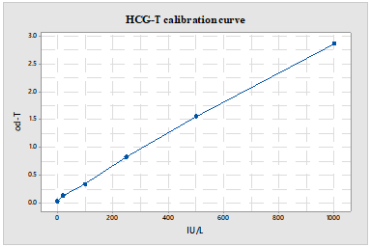
۲. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور **Y** جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور **X** وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

۳. در صورتی از اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت که مجهز به سیستم پردازش داده های داخلی است استفاده می کنید، جهت محاسبه نتایج و ترسیم منحنی کالیبراسیون به دستورالعمل دستگاه مراجعه نمایید. برای محاسبه نتایج کیت **hCG** شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس از مدل محاسباتی نقطه-به-نقطه (**Point-to-point**) استفاده کنید.

داده های نمادین منحنی کالیبراسیون

مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل بعنوان داده های نمادین آورده شده است. لازم به یادآوری است این داده ها فقط جنبه راهنمایی داشته و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید براساس نتایج بدست آمده در آزمایشگاه خویش ترسیم نماید.

Row	OD	IU/L
1	0.02	0.0
2	0.12	20
3	0.33	100
4	0.82	250
5	1.54	500
6	2.85	1000



کنترل کیفی:

در هر کیت یک نمونه کنترل وجود دارد که مقادیر موردانتظار برای آن برروی برچسب ویال درج شده است. علاوه بر کنترل داخل کیت، آزمایشگاه می تواند از نمونه های سرم انباشته (**Pooled serum**) که در خود آزمایشگاه تهیه شده یا نمونه های کنترل خارجی نیز استفاده نماید. در دو حالت یادشده لازم به ذکر است که آزمایشگاه باید مقدار هدف، انحراف معیار نتایج و کرانه های بالایی(**UCL**) و پایینی(**LCL**) قابل قبول را خود محاسبه و مبنای برنامه های کنترل کیفی خویش قرار دهد.

بازه مرجع

دامنه مرجع:

در بررسی دامنه مرجع براساس درون یابی دامنه بین ٪۲/۵ و ٪۹۷/۵ مرکزی با استفاده از کیت **hCG** الایزا شرکت پیشگامان نتایج زیر برای زنان بالغ غیریائسه بدست آمد. لازم به ذکر است به دلیل تفاوت های بیولوژیک بین جمعیت های مختلف، و همچنین عواملی نظیر سن، جنس، نژاد و عوامل جغرافیایی هر آزمایشگاهی باید ابتدا انتقال پذیری(**transferability**) این داده ها را درخصوص جمعیت موردنظر خویش راستی آزمایی(**Verification**) کرده و درصورت مشاهده ناهمخوانی، بازه مرجع خود را بدست آورد.

زنان غیرباردار در سن باروری	N=158	<10 IU/L
مشکوک	-	10-25 IU/L
حاملگی	N=120	>25 IU/L

در افراد باردار طبیعی مقادیر**hCG** در هفته های مختلف (برحسب **IU/L**) بشرح ذیل است:

هفته اول	N=78	25-35
هفته دوم	N=24	35-100
هفته سوم	N=27	100-1000
هفته چهارم	N=32	1000-10000
ماه دوم و سوم	N=85	30000-100000
سه ماه دوم	N=134	10000-30000
سه ماه سوم	N=32	5000-15000

خصوصیات اجرایی کیت

۱- حد پایینی اندازه گیری(Lower limit of measurement) :

حد شاهد(**Limit-of-Blank: LOB**) و حد آشکارسازی (**Limit-of-detection: LOD**) مطابق با راهنمای **EP 17-A2** مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(**CLSI**) بدست آمد.

به طور خلاصه حد بلانک تحت عنوان مقدار صدک ۹۵ ام (**95th percentile**) از ۶۰ بار اندازه گیری برروی نمونه شاهد(استاندارد صفر) طی چندین ران بدست آمد. حد بلانک معادل غلظتی درنظر گرفته شد که ۹۵٪ از ۶۰ نتیجه اندازه گیری های تکراری مقداری کمتر از آن بدست دهد. ، مقدار حد شاهد معادل **0.013 IU/L** بدست آمد.

برای تعیین حد آشکارسازی ۲۰ اندازه گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم(۶۰=۳×۲۰=**n**) با محتوای **hCG** بین ۱-۲ **IU/L** که مقدار **HCG** آن به روش مستقل دیگری تعیین شده بود طی سه روز انجام شد و بزرگترین انحراف معیار اندازه گیری های تکراری بر روی سه نمونه یادشده مبنای تعیین حد آشکارسازی قرار گرفت. از رابطه زیر حد آشکارسازی پس از گرد کردن روبه بالامعادل **1.0 IU/L** تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645SD_{Low\ sample}$$

۲- دقت(Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت **hCG** شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس و ۳ انباشته سرمی تهیه شده از نمونه های در نقاط مختلف بازه اندازه گیری مطابق با راهنمای **EP 05-A3** مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(**CLSI**) بدست آمد.

طی ۱۰ روزکاری، سه کاربر و هر یک روزانه سه ران اندازه گیری های تکراری به صورت دوتایی در هر ران بروی نمونه های یاد شده انجام دادند(۲×۳×۳×۱۰). نتایج با روش آماری **Fully nested ANOVA** تحلیل گردید:

خلاصه نتایج در جدول زیر آورده شده است:

Sample Description	Mean (IU/L)	Repeatability		Within-Laboratory Precision	
		SD	%CV	SD	%CV
Patient Pool	56.1	5.9	10.52	4.20	7.49
Patient Pool	137	9.5	6.93	8.10	5.91
Patient Pool	576	37.5	6.51	38.30	6.65

۳- اختصاصیت(Specificity):

ارزیابی اختصاصیت مطابق با راهنمای **EP 07-A2** مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(**CLSI**)، جهت تعیین واکنش متقاطع (**cross reaction**) کیت سنجش **hCG-Titer** پیشگامان سنجش ایساتیس با سایر هورمون های گلیکوپروتئینی **FSH** ، **LH** و**TSH** صورت گرفت. نمونه های حاوی واکنشگرهای متقاطع از طریق **spike** کردن سرم انسانی طبیعی با مواد حاوی سطوح بالایی از همان واکنشگرها به گونه ای که ماتریکس سرم بیش از ۱۰ درصد تغییر نکند، تهیه شد. سپس مقدار **hCG** همزمان در یک ران در نمونه هایی که با ماتریکس بی اثر**spike** شده بودند و نمونه هایی که با واکنشگرهای متقاطع **spike** شدند، اندازه گیری شد و مقدار واکنش پذیری متقاطع هر نمونه از رابطه زیر محاسبه شد و به صورت نسبت به غلظت **hCG** اولیه بیان گردید. نتایج در جدولی که در ادامه می آید خلاصه شده است:

$$\%\mathbf{cross-reactivity} = \frac{\boldsymbol{mean\ conc.of\ spiked\ sample - mean\ conc.of\ unspiked\ sample}}{\boldsymbol{spiked\ conc.}} \times \mathbf{100}$$

نوع ماده	غلظت	درصد تداخل(٪)
FSH	**500 m IU/ml**	**0.05**
LH	**500 m IU/ml**	**0.37**
TSH	**500 µ IU/ml**	**0.18**

همچنین اثر تداخلی مداخله گرهای متداول برروی کیت سنجش hCG-Titration پیشگامان سنجش ایساتیس بررسی گردید، طی این ارزیابی مشخص شدهموگلوبین تا 50 mg/mL و بیلیروبین تا 20 mg/dL و تری گلیسریدها تا 1000 mg/dL تأثیری بر نتیجه سنجش ندارد.

۴- خطی بودن(Linearity):

به منظور ارزیابی خطی بودن یک نمونه با غلظت hCG اولیه ۸۷۳ IU/L را با نمونه دیگری با غلظت ۲۵ IU/L به نسبت های مختلف با یکدیگر رقیق کردیم و رقت های مختلف را به صورت مضاعف اندازه گیری و نتایج را با مقادیر موردانتظار که به صورت محاسباتی بدست آمده است، مقایسه کردیم و میزان بازیابی و سوگرایی را در نقاط مختلف محاسبه کردیم، که نتایج در جدول زیر خلاصه شده است.

No	Ratio	Expected (IU/L)	Rep 1 (IU/L)	Rep 2 (IU/L)	recovery%	%Bias
1	1	874	854	893	NA	NA
2	0.9	789	775	796	99.60%	-0.40%
3	0.8	704	724	691	100.53%	0.53%
4	0.7	619	605	611	98.23%	-1.77%
5	0.6	534	556	543	102.88%	2.88%
6	0.5	449	432	487	102.28%	2.28%
7	0.4	364	335	356	94.81%	-5.19%
8	0.2	195	184	186	95.02%	-4.98%
9	0.1	110	98	104	91.94%	-8.06%
10	0	25	22.7	27.3	NA	NA

NA: کاربردی ندارد.

۵- درستی(Trueness):

۵-۱- ارزیابی بازیابی(Recovery Evaluation)

ارزیابی خطای سیستماتیک یا **Bias** روش به دو صورت انجام گرفت. ابتدا میزان خطای سیستماتیک نسبی(**Proportional Error**) از طریق مطالعات بازیابی و با افزودن مقادیر مشخص از **hCG** انجام گرفت. به طور خلاصه نمونه اولیه در سه غلظت به دو بخش مساوی تقسیم و به یکی حجمی از سرم حاوی مقدار مشخص **hCG** و به دیگری همان حجم استاندارد صفر به گونه ای که ماتریکس نمونه بیش از ۱۰ درصد تغییر نکند افزوده شد. و سپس بررسی توانمندی سیستم اندازه گیری درتشخیص مقدار افزوده شده از طریق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\%Recovery = \frac{Concentration\ Recovered}{Concentration\ Added} \times 100$$

همچنین مقدار خطای سیستماتیک که به زبان ریاضی با بایاس بیان می گردد، از رابطه زیر بدست آمد:

$$\%Bias = \frac{\bar{X}\ measured - expected}{Expected} \times 100$$

نتایج این ارزیابی در جدول زیر خلاصه شده است:

Sample	Original Concentration (IU/L)	50 IU/L added		100 IU/L added	
		Recovery%	Bias%	Recovery%	Bias%
1	36.2	108.00%	4.64%	111.00%	8.08%
2	312	96.00%	-0.55%	92.00%	-1.94%
3	715	107.00%	0.46%	113%	1.6%

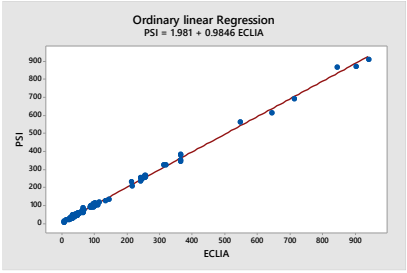
۵-۲- ارزیابی مقایسه ای(Method comparison)

ارزیابی مقایسه ای بین نتایج اندازه گیری کیت سنجش **hCG** سرم شرکت پیشگامان و روش **ECLIA-Cobas E411-Roche diagnostic(HCG stat)** (**n=88 range:7-941 IU/L**) انجام مطابق با راهنمای **EP 09-A2** مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(**CLSI**) به روش رگرسیون خطی تحلیل گردید. خلاصه نتایج و نمودار رگرسیون خطی(**Linear regression**) در ادامه آورده شده است:

$$PSI\ ELISA = 0.9846 ECLIA + 1.981$$

$$r = 0.9988$$

$$r^2 = 0.9976$$



٦- پدیده هوک:

در این کیت پدیده هوک تا غلظت **1000000 IU/L** مشاهده نگردید.

منابع و مراجع:

1. CLSI. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP 17-A2. Pierson-Perry J.F. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2012.

2. CLSI. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline. CLSI document EP 05-A3. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2014.

3. CLSI. Interference Testing in clinical chemistry; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP07-A23. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2005.

4. Kasper D.L. et al. (2015). Harrison's principles of internal medicine.19th ed. Mc Graw Hill Education

5. Marcilac I. Troalen F. et al. (1992) Free human chorionic gonadotropin beta subunit in gonadal and nongonadal neoplasms. Canc Res. 1992; 52:3901-3907.

6. Pagana K.D. et al. (2018). Mosby's Manual of diagnostic and Laboratory tests.6th ed. Elsevier Inc.

7. Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics.6th ed. Elsevier Inc

خطایابی در آزمایش های الایزا

نوع مشکل	علت مشکل	راه حل
پایین بودن OD استانداردها و نمونه ها	افت و یا آلودگی کونژوگه	تکرار تست با کونژوگه جدید
	پایین بودن دما و یا کوتاه بودن زمان انکوباسیون، به دما نرسیدن محلولهای کیت و نمونه بیماران	۱.دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید. ۲.قبل از شروع آزمایش کیت و نمونه بیماران به دمای اتاق برسد.
	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	۱.PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲.پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	۱.پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. ۲.پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.
	طول موج خوانش نامناسب (۴۰۵ nm بجای ۴۵۰ nm)	۱.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. ۲.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
صحیح نبودن نمودار استانداردها	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید.
	پیپتینگ نامناسب	۱.استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف ۲.از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید. ۳.توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. ٤.توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود.

	PH نامناسب و یا غلظت بالایWash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	۱ . PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲.پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD	آلودگی استاندارد صفر	تکرار تست با استاندارد های جدید
	آلودگی محلول رنگزا	استفاده از محلول رنگزا جدید
	آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نامناسب	۱.عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲. تمام سوزن های دستگاه واشر را چک کنید.
	طول موج نامناسب در خوانش	۱.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. ۲.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. ۳.از فیلتر ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید.
	آلودگی محلول Stop	تکرار تست با محلول Stop جدید
عدم تولید رنگ در چاهک ها	استفاده از مواد سایر کیت ها	تکرار تست با مواد همان کیت
	انجام نشدن مرحله ای از تست	تکرار تست
	آلودگی محلول رنگزا	تکرار تست با محلول رنگزا جدید
	آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید	تکرار تست با محلول کونژوگه جدید
	پیپتینگ نامناسب، گرفتگی لوله داخلی سمپلر بواسطه آلودگی	۱. استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف ۲. از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید ۳. توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد.

عدم تکرار پذیری مناسب		٤. توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نشود. ٥. توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد. ٦. کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلر ها
	طولانی شدن زمان انجام تست	فاصله زمانی بین اضافه کردن استاندارد ها و نمونه نباید بیشتر از ۱۰ دقیقه باشد. در این صورت نتایج قابل اعتماد نیست.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید.
	باقی ماندن کونژوگه در لبه چاهکها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک ها	پیپتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	وجود حباب در چاهک ها	در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک ها نباشد.
	کثیف بودن کف چاهکها	کف چاهکها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید.
	مخلوط نشدن محلول های کیت	قبل از استفاده، ویال محلول ها را به آرامی تکان دهید.

INTENDED USE:

For the quantitative determination of human chorionic gonadotropin (hCG) concentration in human serum.

CLINICAL SIGNIFICANCE:

Similarly, to LH, FSH and TSH, human chorionic gonadotropin (hCG) is a member of the glycoprotein family and consists of 2 subunits (α- and β-chains) which are associated as the intact hormone. The α-chains in all four of these glycoprotein hormones are virtually identical, whereas the β-chains have greatly differing structures and are responsible for the respective specific hormonal functions.

Human chorionic gonadotropin consists of a number of isohormones with differing molecular size. The biological action of hCG serves to maintain the corpus luteum during pregnancy, and hence, progesterone production, during the first trimester. The serum of pregnant women contains mainly intact hCG.

Measurement of the hCG concentration permits the diagnosis of pregnancy just one week after conception. The determination of hCG in the 1st trimester of pregnancy is of particular importance.

Elevated values here serve as an indication of hydatid form mole or multiple pregnancy. Depressed values indicate threatening or missed abortion, ectopic pregnancy or intra-uterine death. Elevated values in the absence of a pregnancy are indicative of a tumor. The specific monoclonal antibodies used recognize the hollo-hormone. The PSI hCG titration kit should therefore be used in particular in the diagnosis and monitoring of pregnancy.

PRINCIPLE:

The PSI hCG EIA Kit is a solid-phase, non-competitive immunoassay based upon the direct sandwich technique. In the 1st incubation phase hCG present in serum samples or calibrators/controls reacts with biotinylated monoclonal antibody against alpha subunit. The strips are then washed and 2nd HRP-conjugated monoclonal antibody against beta-subunit are added to wells. hCG present in calibrators/controls or samples reactes with both antibodies to form a sandwich complex and also adsorbed to the streptavidin coated microstrips via biotinylated anti-alpha subunit mab. The strips are then washed and, buffered substrate/chromogen reagent (hydrogen peroxide and tetramethylbenzedine) is added to each well and the enzyme reaction is allowed to proceed. During the enzyme reaction a blue color will develop and the intensity of the color is directly proportional to the amount of hCG present in the samples.

READENTS PROVIDED:

Reagent	Quantity/48 Test KIT	Quantity/96 Test KIT	Quantity/192 Test KIT	Reconstitution
Microplate (96 breakable wells) coated with Streptavidin	48 wells	96 wells	192 wells	Ready to Use
Standard 0 (Buffer without hCG compatible with human serum matrix containing preservative)	1 ×5.0 mL	1 ×5.0 mL	1 ×5.0 mL	Ready to Use
Calibrators 2-6 (20, 100, 250, 500, 1000 IU/L) in buffer, containing preservative with traceability to reference material "3rd ISO WHO 75/539"	5 Vial/0.5 ml	5 Vial/0.5 ml	5 Vial/1.0 ml	Ready to Use
Controls N = 2 in buffer compatible with human serum matrix with preservatives	2 Vial/0.5 ml	2 Vial/0.5 ml	2 Vial/1.0 ml	Ready to Use
Assay Buffer	1 Vial/6.0 ml	1 Vial/12 ml	2 Vial/12 ml	Ready to use
Enzyme Conjugate (red color)	1 Vial/6.0 ml	1 Vial/12 ml	2 Vial/12 ml	Ready to use
Concentrated Wash solution	1 Vial/30ml	1 Vial/30 ml	1 Vial/50 ml	Dilute 20X with distilled water
Substrate-Chromogenic solution (Tetra-methylbenzedine and hydrogen peroxide)	1 Vial/6.0ml	1 Vial/12ml	2 Vial/12 ml	Ready to Use
Stop solution (H2So4 0.12M) Additional information about other additive is considered proprietary.	1 Vial/6.0 ml	1 Vial/6.0 ml	1 Vial/12.0 ml	Ready to Use

Materials required but not supplied with kit

The following materials are required but not provided in the kit:

- Distilled water with conductivity < 1µS/cm
- Precision micropipettes for delivery of,25, 50, 100 microliters. An 8-channel pipette or respenser pipette with disposable plastic tips for delivery of 50-100 µL is useful but not essential. Pipettes for dispensing milliliter volumes.
- Vortex mixer
- Automatic washer or any other device which can deliver 350 microliter wash solution for microplates
- Microplate reader with a wavelength of 450 nm and 620-650 nm, and an absorbance range of 0-3.0

STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- If kept at 2-8 °C, before opening, all kit components are stable until the expiry date as indicated on the label on the outside of the kit box.
- Calibrator concentrations are displayed on vial labels and may vary between lots.
- Do not freeze kits.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the preparation day.
- Each lot of reagents and calibrators has been standardized to produce the correct reaction.

Do not interchange the reagents or calibrators between lots.

- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration. Chromogenic solution TMB should be colorless. A blue color indicates that the reagent has been contaminated and should be discarded.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Human serum and EDTA plasma are samples of choice for PSI hCG kit.
- Do not use grossly haemolysed or turbid samples.
- If the measurement cannot be done within 24 hours after sample collection, samples should be kept at 2-8 °C up to 48 hours. For longer storage serum or plasma must be stored at -20°C.
- Avoid repeated freeze and thaw cycles. Frozen specimens must be gently but thoroughly mixed after thawing.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

- For Professional in vitro diagnostic Use Only.
- Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the instruction for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
- Please refer to the U.S. Department of Health and Human Services (Bethesda, Md., USA) publication No (CDC) 88—8_95 on laboratory safety procedures or any other local or national regulation.
- Handle all patient specimens as potentially infectious.
- Reagents contain sodium azide (NaN3) as a preservative. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. Follow local guidelines for disposal of all waste material.
- Avoid any skin contact with all reagents, stop solution contains strong acid. In case of contact, wash thoroughly with soap and water.

Caution

Material used in the preparation of human source reagents has been tested and found to be non-reactive for HIV 1 & 2 antibodies, HCV antibody and hepatitis B Surface Antigen (HBsAg). Since no method can completely rule out the presence of blood borne diseases, the handling and disposal of human source reagents from this product should be made as if they were potentially infectious.

Preparation of reagents:

Wash Buffer:

According to volume required, pour the desired volume of wash concentrate into a clean container and dilute 20 fold by adding adequate volume of distilled or deionized water to give a buffered Wash Solution. E.g. 10 mL wash concentrate to 190 mL distilled water. Wash solution should be prepared daily and discard unused working wash solution at the end of the day.

HANDELING NOTES

1. Do not use the kit or components beyond expiry date.
2. Do not mix up vials caps.
3. Bring all the reagents to room temperature prior to use.
4. Thoroughly mix all reagents, calibrators/controls and samples by gentle agitation or swirling.
5. Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
6. Use a clean container and high-quality distilled or deionized water to prepare the working

wash solution.

7. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
8. For the dispensing of Chromogenic solution and Stop solution avoid pipettes with metal parts.
9. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
10. Adhere the incubation times carefully. Tolerance limit of incubation time is ±5%
11. To avoid drift, the time between pipetting of the first calibrator and the last sample must not be more than 10 minutes (Time delay). It is strongly recommended not to run more than 5 strips when pipetting manually.
12. Perform all steps consecutively without any delay. Any delay in each step has deleterious effects on final results.
13. Draw a calibration curve for each run, do not use stored curve from previous runs.
14. Incubation with Chromogenic solution, must be done in dark.
15. Opened reagents are stable maximally for 8 weeks if they are not contaminated, and stored in resealed original containers and handled as prescribed. Return to 2-8°C immediately after use

Measurement Procedure

1. Transfer the required number of microplate strips to a strip frame. (Immediately return the remaining strips to the aluminum pouch containing a desiccant and reseal carefully and store at 2-8°C.
2. Pipette 25 µL of each Calibrator (calibrators 0, 20, 100, 250, 500, 1000 IU/L), control and patient samples in duplicate into the appropriate wells.
3. Pipette 100 µL of Assay Buffer into each well. Avoid carry-over by holding the pipette tip slightly above the top of the well and avoid touching the plastic strip or surface of the liquid.
4. Gently mix for 15 seconds
5. Cover the plate with an adhesive seal and incubate for 20-minutes at room temperature(20-27°C).
6. Wash the plate according to procedure below.
    a. Carefully dispense 350 µL of working wash solution into each well.
    b. Aspirate the content of each well.
    c. Repeat 4 additional wash for a total of 5 wash cycles.
    d. After the end of last wash cycle invert the plate and tap it carefully against an absorbent paper.

Note: Automatic strip washer: Follow the manufacturer's instructions for maintenance and wash the required number of wash cycles.

7. Pipette 100 µL of Enzyme conjugate into each well.
8. Cover the plate with an adhesive seal and incubate for 20-minutes at room temperature(20-27°C).
9. Wash the strips 5 times as previously described in procedural note 6.
10. Add 100 µL of Chromogenic solution TMB to each well using the same pipetting technique as in item 3. The Chromogenic solution TMB should be added to the wells as quickly as possible and the time between addition to the first and last well should not exceed 2 min.
11. Incubate for 10 min at room temperature preferentially in the dark.
12. Add 50 µL of Stop Solution, mix and read the absorbance at 450 nm (with a reference filter 620, 630, or 650) in a microplate spectrophotometer within 10 min after addition of Stop Solution.

Important Note: *always add stop solution in the same order as chromogenic solution TMB.*

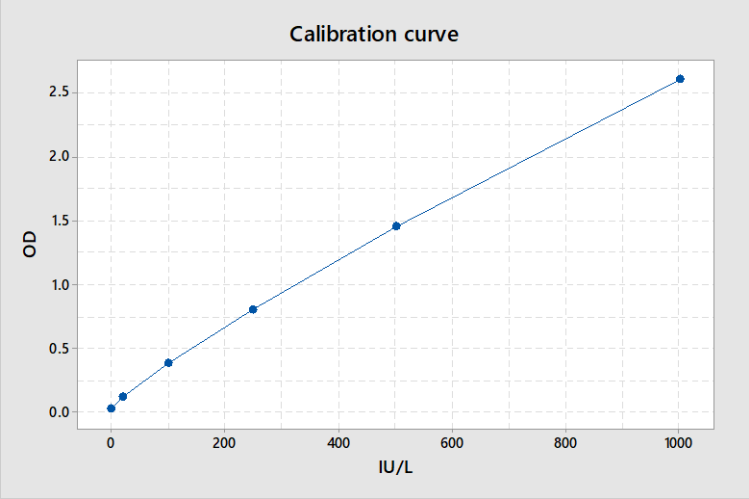
CALCULATION OF RESULTS

1. Construct a calibration curve by plotting the average O.D. (450 nm) for each calibrator on the vertical (Y) axis against the concentration on the horizontal (X) axis, and draw a best fit curve through the points on the graph.
2. To determine concentration of hCG in each sample, first locate the O.D. value on the Y-axis and extend a horizontal line to the calibration curve. At the point of intersection, draw a vertical line to the X-axis and read the corresponding concentration.
3. If a microplate spectrophotometer with built-in data calculation program is used, refer to the manual for the spectrophotometer and create a program using the concentration stated on the label of each of the hCG calibrators. For automatic calculation of hCG results it is recommended to use point-to-point method.

Typical Data

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real-time calibration curve.

Row	OD	U/L
1	0.025	0.0
2	0.110	20
3	0.380	100
4	0.800	250
5	1.450	500
6	2.600	1000



Quality control

hCG low and high control serum should be used for validation of the assay series. Ranges of expected results are indicated on the vial labels. If assigned range are not obtained, a complete check of reagents and reader performance should be made and the assay shall be repeated. Each laboratory can also prepare its on serum pools at different levels, which can be used as internal controls in order to ensure the precision of the assay.

Expected values

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values. In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the PSI hCG ELISA the following values are observed:

Pre-menopausal Non-pregnant women	**N=158**	**<10 IU/L**
Suspicious	-	10-25 IU/L
Pregnancy	N=120	>25 IU/L

Pregnant women in different pregnancy weeks

Weeks of pregnancy	2.5th percentile(IU/L)	97.5th percentile(IU/L)
4 weeks	5.0	100
5 weeks	200	3,000
6 weeks	10,000	80,000
7-14 weeks	90,000	500,000
15-26 weeks	5,000	80,000
27-40 weeks	3,000	15,000

PERFORMANCE CRITERIA

1. Lower limit of measurement:

The Limit of Blank and Limit of Detection were determined according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A2 guideline.

In brief Limit of Blank was determined as the 95th percentile value from n = 60 measurements on standard 0 over several runs. The Limit of blank equals to the concentration that 95% of repeated measurements on zero standard give value below it. In the next step we determined standard deviation of repeated measurements on 3 samples with hCG contents less than 2.0 IU/L determined from a separate method study (ECLIA Method). By adding the LOB calculated at 1st step to 1.645 times the greatest standards deviation calculated in the 2nd step($LOD = LOB + 1.645SD_L$) LOD calculated as 1.0 IU/L.

2. Precision:

Precision was determined using PSI hCG lit reagents and three pooled human sera according to EP05-A3 Guideline.

Three runs per day (morning, midday and afternoon) by 3 user in 10 working days($10 \times 3 \times 3$). Results analyzed by fully nested ANOVA. Following results were obtained:

Sample Description	Mean (IU/L)	Repeatability		Within-Laboratory Precision	
		SD	%CV	SD	%CV
Patient Pool	**78.2**	**5.9**	**7.54**	**4.2**	**5.37**
Patient Pool	**353.8**	**20.8**	**5.88**	**8.1**	**2.29**
Patient Pool	**850.6**	**39.1**	**4.6**	**38.3**	**4.5**

3. Specificity:

Specificity evaluation was performed according to guideline CLSI EP07-A2 to assess the cross-reactivity of the assay with glycoproteins hormones LH, FSH and TSH. Samples containing cross-reactants was prepared by spiking natural human sera with material containing high levels of cross-reactants. Modification of serum matrix was no more than 10%. The % cross-reactivity was calculated for each sample using the equation below and normalized to the hCG content:

$$\%cross - reactivity = \frac{mean\ conc.\ of\ spiked\ sample - mean\ conc.\ of\ unspiked\ sample}{spiked\ concentration} \times 100\%$$

The results are summarized in the following table:

Cross-reactants	concentration	% Cross-reaction
FSH	**500 m IU/ml**	**0.05**
LH	**500 m IU/ml**	**0.37**
TSH	**500 µ IU/ml**	**0.18**

Interference evaluation from common sample abnormalities, hemolysis, Lipemia and icterus were also performed according to aforementioned document and %interference calculated using following formula:

$$\%interference = \frac{measured\ value - true\ value}{true\ value} \times 100\%$$

No interference were seen up to following listed concentration:

Interferent	source	Final concentration of interferent in test serum
Hemoglobin	Fresh haemolysed blood	**50 mg/mL**
Conjugated Bilirubin	Commercially crystalline Unconjugated Bilirubin	**20 mg/dL**
Triglycerides	Commercially Intralipid 10%	**1000 mg/dL**

4. Linearity

Evaluation of Linearity was performed according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP 06-A guideline

In brief a sample with concentration of 930 IU/L hCG as a high sample was diluted with another sample with 25 IU/L in different proportions and their hGG, measured in duplicate on each dilution. Measured values compared with expected values which estimated by dilution formula, then % bias and %recovery calculated for each concentration and following results are obtained:

No	Ratio	Expected (IU/L)	Rep 1 (IU/L)	Rep 2 (IU/L)	recovery%	%Bias
1	**1**	**930**	**930**	**930**	**NA**	**NA**
2	**0.9**	**839.5**	**845**	**839**	**100.30%**	**0.30%**
3	**0.8**	**749**	**751**	**727**	**98.66%**	**-1.34%**
4	**0.7**	**658.5**	**631**	**667**	**98.56%**	**-1.44%**
5	**0.6**	**568**	**515**	**543**	**93.13%**	**-6.87%**
6	**0.5**	**477.5**	**452**	**457**	**95.18%**	**-4.82%**
7	**0.4**	**387**	**375**	**365**	**95.61%**	**-4.39%**
8	**0.2**	**206**	**197**	**186**	**92.96%**	**-7.04%**
9	**0.1**	**115.5**	**125**	**129**	**109.96%**	**9.96%**
10	**0**	**25**	**25**	**25**	**NA**	**NA**

NA: Not applicable

5. Trueness:

5.1. Recovery Evaluation (Proportional error)

Recovery was assessed by adding different amounts of hCG to 3 samples with different concentrations. Then

% recovery and % bias was calculated for each sample using the equations below:

$$\%Recovery = \frac{Concentration\ Recovered}{Concentration\ Added} \times 100$$

$$\%Bias = \frac{\bar{X}\ measured - expected}{Expected} \times 100$$

The results are summarized in the following table:

Sample	Original concentration	50 IU/L added		100 IU/L added	
		Recovery %	Bias%	Recovery %	Bias%
1	45.8 IU/L	109.00%	4.70%	109.00%	6.17%
2	345 IU/L	95.00%	-0.63%	95.00%	-1.12%
3	725 IU/L	112.00%	0.77%	98.00%	-1.21%

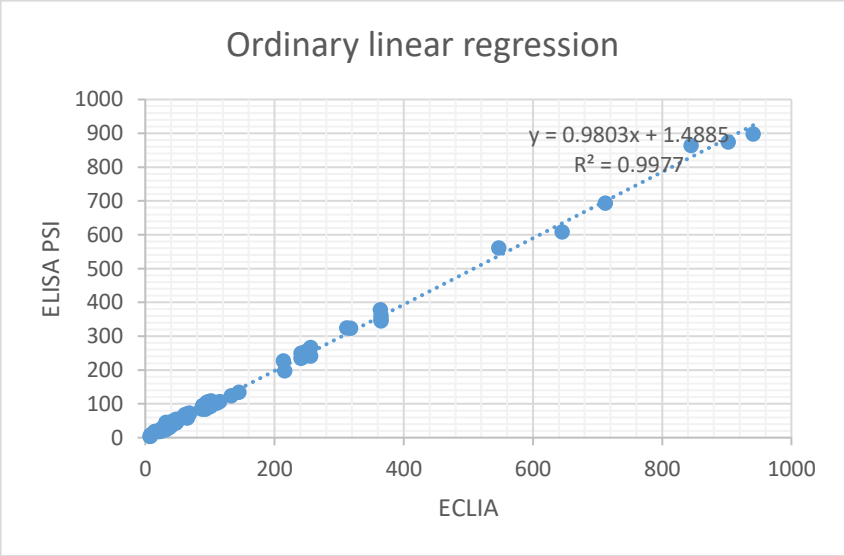
5.2. Method comparison:

A comparison of the PSI hCG ELISA kit (y axis) using patient samples (**n=88 range:7-941 IU/L**) with **ECLIA-Cobas E411-Roche diagnostic (HCG stat)** (X axis) gave the following results by ordinary linear regression:

$$\boldsymbol{PSI\ hCG ELISA = 0.9803\ hCG ECLIA - 1.4885}$$

$$\boldsymbol{r = 0.9988}$$

$$\boldsymbol{r^2 = 0.9967}$$



6. High dose hook effect

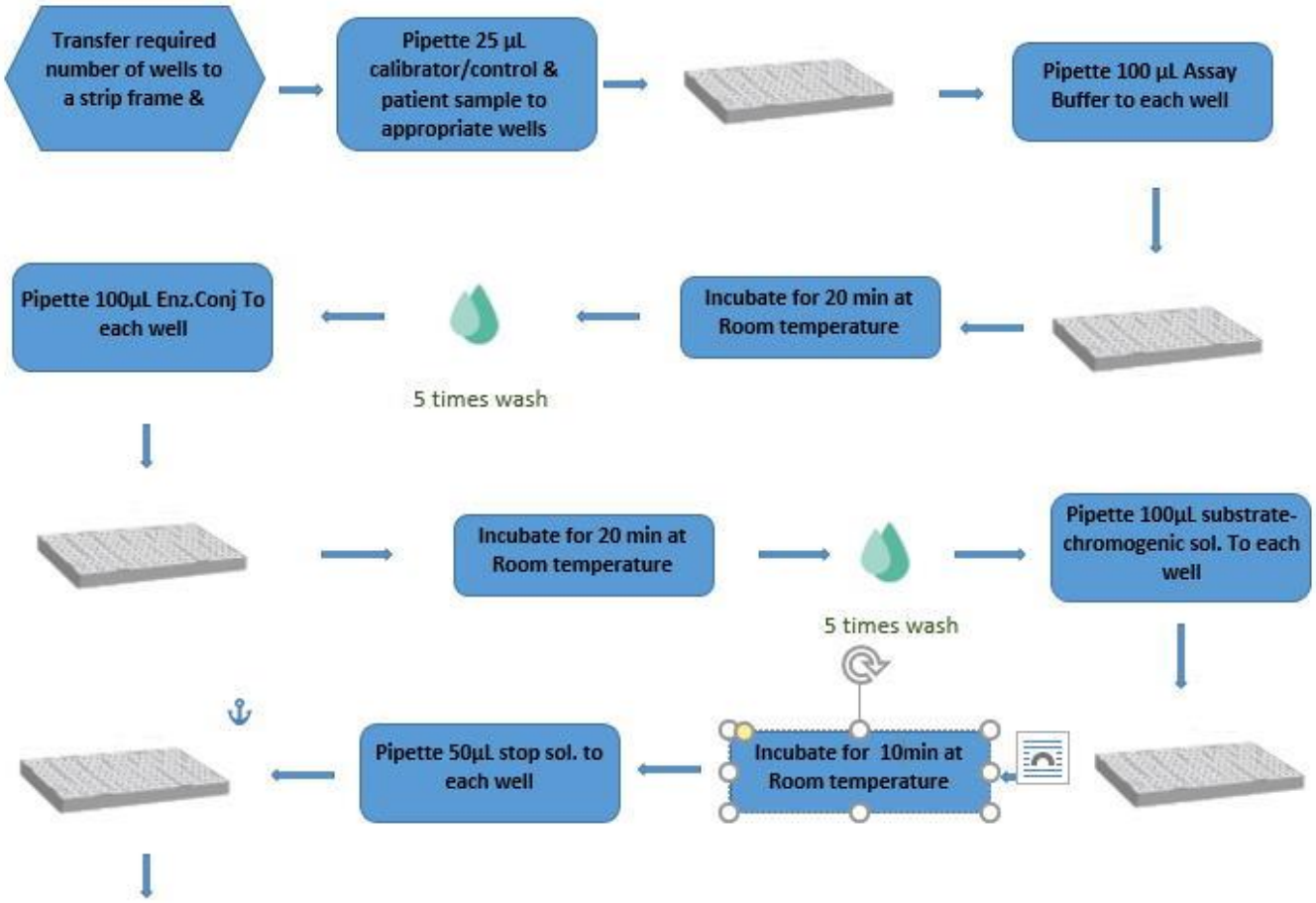
In PSI hCG EIA kit high dose hook effect has not been seen up to 1000000 IU/L

References:

1. **CLSI. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP 17-A2. Pierson-Perry J.F. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2012.**
2. **CLSI. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline. CLSI document EP 05-A3. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2014.**
3. **CLSI. Interference Testing in clinical chemistry; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP07-A23. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2005.**
4. **Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias,derived from intra- and inter-individual biologic variation, https://www.westgard.com/biodatabase1.htm**
5. **Kasper D.L. et al. (2015). Harrison's principles of internal medicine.19th ed.(page. 124e-5) Mc Graw Hill Education**
6. **Marcilac I. Troalen F. et al.(1992) Free human chorionic gonadotropin beta subunit in gonadal and nongonadal neoplasms. Canc Res. 1992;52:3901-3907.**
7. **Pagana K.D. et al. (2018). Mosby's Manual of diagnostic and Laboratory tests.6th ed. Elsevier Inc.**
8. **Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics.6th ed. Elsevier Inc.**
9. **Royal college of pathologists of Australasia. https://www.datainnovations.com/allowable-total-error-table**

hCG-titer ELISA KIT		IVD-REF: PS – HCG.T
		Ver. No: 02

Procedure in-brief



Read at
450/630 nm