IVD-REF: PS - HCG.R	پیشگامان سنجش پیشگام در سنجش و نوآوری	کیت الایزاHCG-Rapid
Ver. No: 04		HCG-Rapid ELISA KIT

معرف	۴۸ تستی	۹۶ تستی	۱۹۲ تستی	آماده سازی
پلیت پوشیده شده با استرپتاویدین	1×48 wells	1×96 wells	2×96 wells	آماده مصرف
استاندارد صفر(بافر عاری از آنالیت، سازگار با سرم انسانی همراه با نگهدارنده)	1 ×5.0 mL	1 ×5.0 mL	1 ×5.0 mL	آماده مصرف
کالیبراتور۲-۶ (۲۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ IU/L) در بافر، به همراه نگهدارنده کالیبره شده علیه ماده مرجع 3rd ISO WHO 75/539	5 ×0.5 mL	5 ×1.0 mL	5 ×2.0 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 ×1.0 mL	1 ×2.0 mL	آماده مصرف
بافر سنجش **Assay Buffer** (سبزرنگ)	1 ×3.0 mL	1 ×6.0 mL	1×12.0 mL	آماده مصرف
کونژوگه(قرمز رنگ)	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	2 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول شستشو غلیظ	1 ×30 mL	1 ×30 mL	1 ×50 mL	به نسبت ۱ به ۲۰ با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید.
محلول سوبسترا–رنگ زا(تترامتیل بنزدین و آب اکسیژنه)	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	2 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول توقف (اسید کلریدریک ۱ مولار)	1 ×6.0 mL	1 ×6.0 mL	1×12.0 mL	آماده مصرف

IVD-REF: PS - HCG.R	پیشگامان سنجش	کیت الایزاHCG-Rapid
Ver. No: 04		HCG-Rapid ELISA KIT

کاربرد:

کیت **HCG Rapid 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 :

گنادوتروپین جفتی انسانی همانند هورمونهای **FSH**، **LH** و **TSH** به خانواده گنادوتروپین 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 مسؤل اعمال هورمونی اختصاصی هر یک از آنها می باشد.

گنادوتروپین 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. در سرم زن باردار عمدتاً فرم هورمون کامل وجود دارد.

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 هیداتی فرم و حاملگی چندقلویی دلالت دارد. کاهش مقدار 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 مورداستفاده قرار گرفته اند، توانایی شناسایی فرم کامل **hCG** را دارند، لذا این کیت باید در تشخیص و پایش حاملگی مورداستفاده قرار گیرد.

اساس آزمایش :

مبنای کیت سنجش **hCG** شرکت تولیدی-تحقیقاتی پیشگامان سنجش ایساتیس بر پایه اصول الایزا نوع ساندویچی می باشد. در این کیت از فن آوری استرپتاویدین در پوشاندن فاز جامد استفاده شده است. در این روش، 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 ۵ دقیقه رنگ آبی بوجود می آید. با افزودن محلول متوقف گر، واکنش آنزیمی متوقف می گردد. 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 میکرو لیتری 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 جاذب رطوبت

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 نم 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 جا به 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 ترجیحا 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**C**$^{\circ}$۲۰- 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 طبی 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 بدقت مطالعه نموده و اطمینان حاصل کنید که تمامی نکات آن را بخوبی فراگرفته 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 وتکنیک 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 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 (۲۷-۲۰درجه سانتی گراد) 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 جدا شدن پیوندهای غیر اختصاصی و جذب نوری زمینه (**Background**) می گردد.

۲. کیفیت آب مقطر مصرفی در کیفیت محلول شستشو و جدا کردن پیوندهای غیر اختصاصی 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 الایزا۲۰ تا۲۷ درجه سانتیگراد می باشد.

۶. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی 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 مورد استفاده 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** شرکت پیشگامان سنجش به دلیل استفاده از استرپتاویدین برای پوشاندن کف چاهک، تا زمان افزودن بافر سنجش عملاً واکنشی در چاهک رخ نمی دهد، اما به دلیل کوتاهی زمان انکوباسیون در مراحل مختلف امکان ران کردن هم زمان تعداد زیادی نمونه وجود ندارد. قویاً توصیه می شود، در هر ران بیش از ***سه*** استریپ نمونه(حداکثر ۲۴ نمونه) را موردآزمایش قرار ندهید. برای پرهیز از خطای ناشی از اختلاف زمانی، استفاده از تجهیزاتی نظیر دیسپنسر اتوماتیک یا سمپلر هشت کاناله برای ریختن معرف ها استفاده کمک قابل توجهی به بهبود نتایج سنجش می نماید.

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

۳- ۵۰ 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، آنرا به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق(**۲۰-۲۵°C**) 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 رطوبت گیر تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.

• بهتراست 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 ، به تمام چاهک ها اضافه کنید، درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق(**۲۵-۲۰°C**) 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 ۵ 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 رفرانس 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.

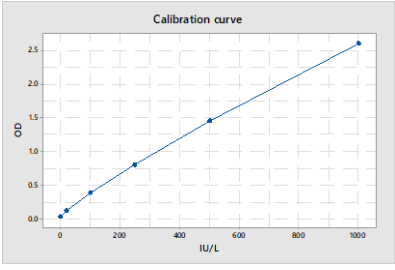
۲. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور **Y** جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور **X** وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

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	0.025	0.0
2	0.110	20
3	0.380	100
4	0.800	250
5	1.450	500
6	2.600	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 یاد شده 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

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 (بارور) 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 راستی آزمایی(**Verification**) کرده و درصورت مشاهده ناهمخوانی، بازه مرجع خود را بدست آورد.

زنان غیربارادار 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**0.015 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 یاد شده 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 **pooled serum** 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	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

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** 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-Rapid 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 ۹۳۰ 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 ونتایج 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**	**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: کاربردی ندارد.

۵- درستی(Trueness):

۵-۱- ارزیابی بازیابی(Recovery Evaluation)

ارزیابی خطای سیستماتیک یا بایاس 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 **Bias** 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	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%

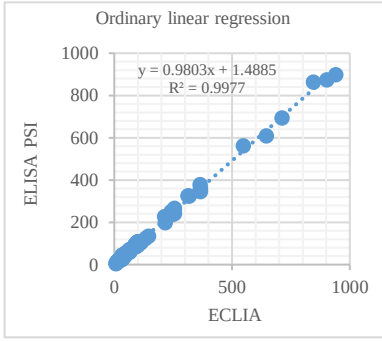
۵-۲- ارزیابی مقایسه ای(Method comparison)

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:

$$PSI\ ELISA = 0.9803 ECLIA + 1.4885$$

$$r = 0.9988$$

$$r^2 = 0.9967$$



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 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.
	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 (۴۵۰ nm بجای ۴۰۵ 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.

		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
عدم تکرار پذیری مناسب	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.

hCG Rapid ELISA KIT	PISHGAMAN SAMJESH ISATIS	IVD-REF: PS – HCG.R Ver. No: 02

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 to make the intact hormone. The a-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. hCG serves to maintain The biological action of the corpus luteum during pregnancy. It also influences steroid production. 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 pregnancy are indicative of a tumor. The specific monoclonal antibodies, which are used, recognize only the holo-hormone, therefore, the PSI hCG Rapid ELISA kit should be used in particular in the diagnosis and monitoring of pregnancy.

PRINCIPLE:

The PSI hCG rapid EIA kit is a solid-phase, non-competitive immunoassay based upon the direct sandwich technique. Calibrators, controls and patient samples are first incubated with a biotinylated Anti-hCG monoclonal antibody in a streptavidin-coated microstrips and a bound/free separation is performed by a solid-phase washing. Then during the 2nd incubation, HRP-conjugated Anti-hCG monoclonal antibody which recognizes hCG from different sites is added to microstrips. Existing hCG in calibrators/controls or samples reacts with both antibodies to form a sandwich complex. This complex is adsorbed to the streptavidin coated microstrips via the biotinylated Anti-hCG Mab. The strips are then washed and buffered substrate/chromogen reagent (hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine) 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.

Reagent and material supplied in the kit:

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 to 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/1.0 ml	5 Vial/2.0 ml	Ready to Use
Controls N = 1 in buffer compatible with human serum matrix containing preservatives	1 Vial/0.5 ml	1 Vial/1.0 ml	1 Vial/2.0 ml	Ready to Use
Assay Buffer-Biotinylated Anti-hCG	1 Vial/3.0 ml	1 Vial/6 ml	1 Vial/12 ml	Ready to use
Enzyme Conjugate-HRP conjugated Anti-hCG (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 1:20 with distilled water
Substrate-Chromogenic solution (Tetramethylbenzidine 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 the 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
- Precise micropipettes for delivery of, 50, 100, microliters. An 8-channel pipette or respenser pipette with disposable plastic tips for delivery of 50-200 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 or reconstitution, all kit components are stable until the expiry date as indicated on their label.
- Calibrators' concentration is displayed on the 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. 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 Rapid 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.
- All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of intact hCG in human serum. The kit is not calibrated for the determination of hCG in urine, Non-EDTA plasma or other specimens of human or animal origin.
- Before starting the assay, read the working manual completely and carefully. Use the valid version of the instruction 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 are potentially infectious.

Preparation of reagents

Wash Buffer:

According to the required volume, 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 gain 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 the expiry date.

2. Do not mix up vial 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 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. Although, PSI hCG EIA kit uses streptavidin coated plate technology and reaction does not proceed before adding conjugate solution, but to avoid drift, arising from short incubation times or low volume sample evaporation, it is strongly recommended not to test more than 3 strips, each run (Time delay).
12. Perform all steps consecutively without any delay. Any delay in each step has deleterious effects on 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 the dark.
15. Only standard 0 may be used to dilute any high serum samples. The use of any other reagent may lead to false results.
16. 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.

PROCEDURE:

1. Take out the microplate with the required number of strips. The left strips are placed in the plastic pouch along with the silica gel bag, and seal it.
2. Pipette 50 µl of standards, control and sera into the wells.
3. Pipette 50 µl of Assay Buffer into each well.
4. Mix gently and cover the strips with a plate sealer. Incubate at room temperature for 5 minutes.
5. Wash the plate according to procedure below.
    i. Carefully dispense 350 µL of working wash solution into each well.
    ii. Aspirate the content of each well.
    iii. Repeat 4 additional wash for a total of 5 wash cycles.
    iv. After the 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

6. Pipette 100 µl of Enzyme conjugate into each well and Incubate at room temperature for 5 minutes.
7. Wash as described in procedural note 5.

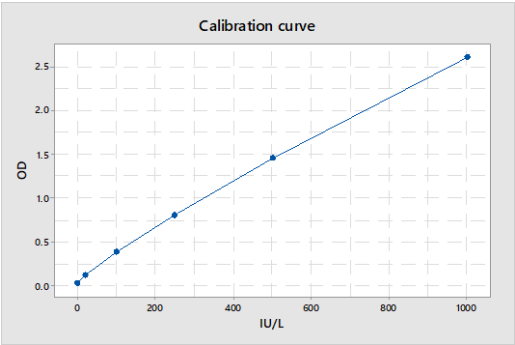
8. Pipette 100 µl of Substrate-Chromogenic solution into each well and Incubate in the dark at room temperature for 5 minutes

9. Add 50 µL of Stop Solution, mix and read the absorbance at 450 nm (with 620, 630, or 650 nm as reference filter) 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 calibrator. For automatic calculation of hCG results, it is recommended to use point-to-point method.
4. The following data are for illustration only and never should be used instead of the real-time calibration curve.



Standards IU/L	OD 450nm
0	0.025
20	0.110
100	0.38
250	0.8
500	1.45
1000	2.6

Quality control:

hCG 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 own serum pools at different levels, which can be used as internal controls in order to ensure the precision of the assay.

Expected values:

A study with PSI hCG Rapid ELISA kit was performed using samples from some healthy non-menopausal non-pregnant and pregnant women and also referring to some published scientific literature following reference interval corresponding to 2.5th and 97.5th percentiles of results was extrapolated.

Each laboratory should first investigate the transferability of the recommended expected value to its own patient population and if it does not match, determine its own reference interval:

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 AND CHARACTERISTICS:

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 three samples with hCG contents less than 2.0 IU/L determined from a separate method study (ECLIA Method). By adding, the LOB calculated at first step to 1.645 times the greatest standards deviation calculated in the second step ($LOD = LOB + 1.645SD_L$) LOD calculated as 1.0 IU/L.

Specificity:

Specificity evaluation was performed according to guideline CLSI EP07-A2 to assess the cross-reactivity of the assay with common hCG cross reactants. 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**

No interference, from common serum abnormalities, 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**

Precision and reproducibility:

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

Three runs per day (morning, midday and afternoon) by 3 users in 10 working days (10 × 3 × 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

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	52	108%	3.92%	111%	7.24%
2	337	95%	-0.65%	93%	-1.60%
3	845	110%	0.56%	106%	0.63%

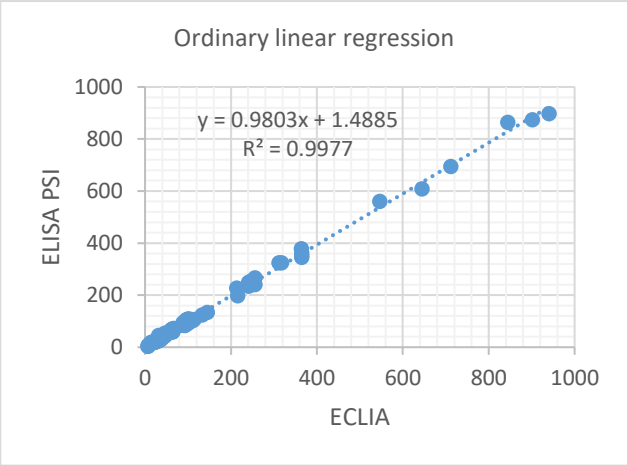
Method comparison:

Comparison of the PSI hCG Rapid kit (y axis) using patient samples (n=88 941 IU/L) with ECLIA-Cobas E411-diagnostic(HCG stat) (X axis) gave the following results by Linear regression

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

$$\boldsymbol{r = 0.9988}$$

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



ELISA range:7-Roche

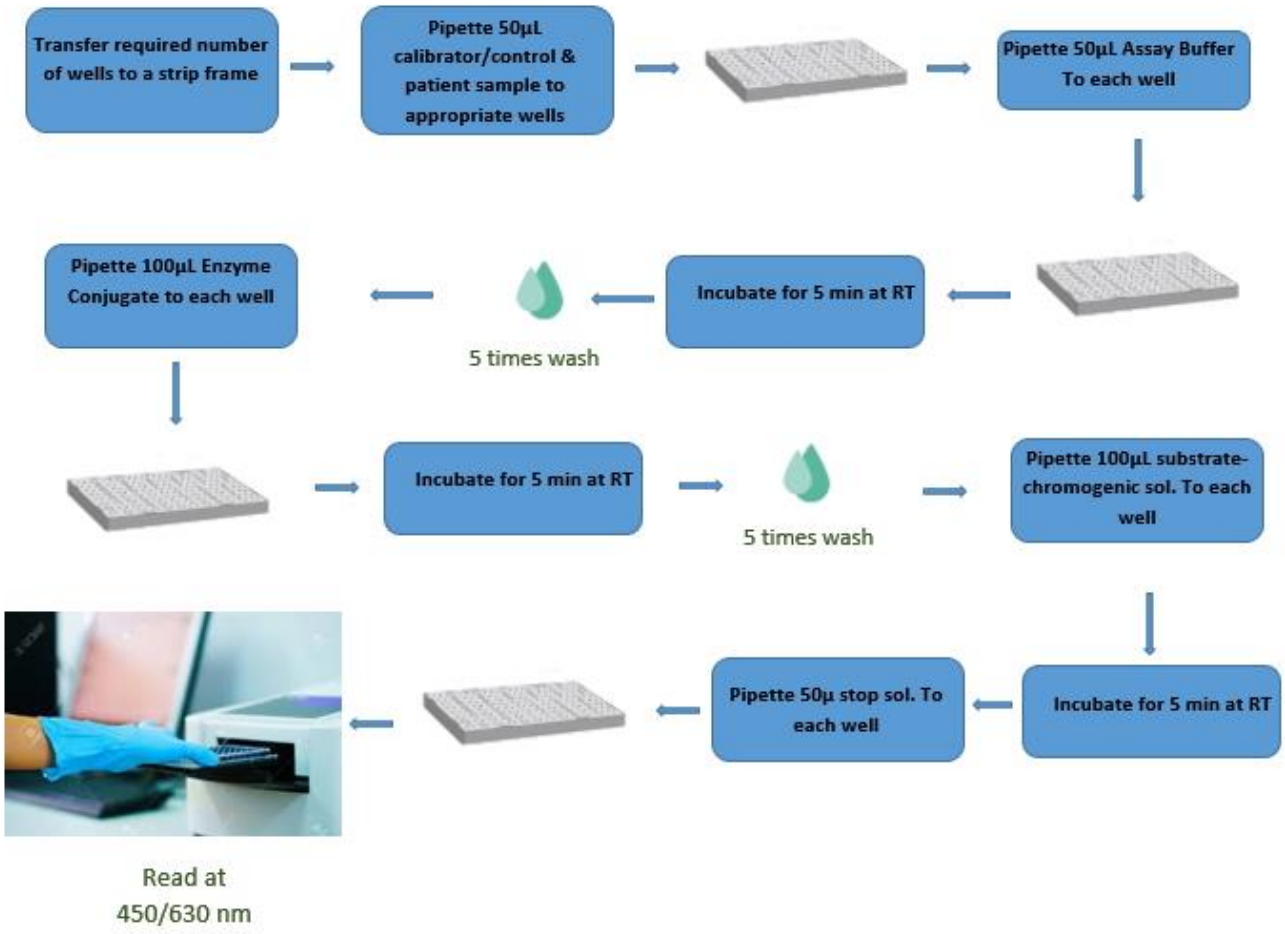
Hook effect:

There is no high dose "hook effect" up to the hCG concentration of 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-**

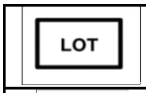
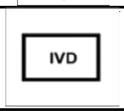
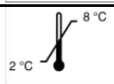


total-error-table

\

Procedure in brief

SYMBOLS:

	**BATCH NUMBER**
	USE BY
	MANUFACTURER
	CONTAINS SUFFICIENT FOR <n> TESTS
	***IN VITRO* DIAGNOSTIC MEDICAL DEVICE**
	**TEMPERATURE LIMITATION**
	CATALOGUE NUMBER
	CONSULT INSTRUCTIONS FOR USE