

IVD-REF: PS - HCG.R	 پیشگامان سنجش پوهانگاه در سنجش‌های و تشخیص‌های	کیت الایزا HCG-Rapid
Ver. No: 07		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
کالیبراتور ۲-۵ (۲۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ IU/L) در بافر، به همراه نگهدارنده کالیبره شده علیه ماده مرجع 3 rd ISO WHO 75/539	4 ×0.5 mL	4 ×1.0 mL	4 ×2.0 mL	آماده مصرف
نمونه کنترل در بافر سازگار با سرم انسانی همراه با نگهدارنده) بازه قابل قبول سرم کنترل بر روی برجسب 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 پژوهشگاه در زمینه تشخیص و کنترل کیفیت	کیت الایزا HCG-Rapid
Ver. No: 07		HCG-Rapid ELISA KIT

کاربرد:

کیت **HCG Rapid ELISA Kit** شرکت پیشگامان سنجش ایستاتیس 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 **LH**، **FSH** 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 مورد استفاده قرار گرفته اند، توانایی شناسایی فرم کامل **hCG** را دارند، لذا این کیت باید در تشخیص و پایش حاملگی مورد استفاده قرار گیرد.

اساس آزمایش:

مبنای کیت سنجش **hCG** شرکت تولیدی-تحقیقاتی پیشگامان سنجش ایستاتیس بر پایه اصول الایزا نوع ساندویچی می باشد. در این کیت از فن آوری استرپتاویدین در پوشاندن فاز جامد استفاده شده است. این روش، استاندارد یا کنترل یا نمونه بیمار هم زمان با بافر سنجش که حاوی آنتی بادی بیوتینیل 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، کونژوگ متصل به آنزیم **HRP** که نسبت به آنتی بادی بیوتینیل، **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 فاز جامد متصل

IVD-REF: PS - HCG.R	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص و کنترل کیفیت	کیت الایزا HCG-Rapid
Ver. No: 07		HCG-Rapid ELISA KIT

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. سمپلهای ۵۰ و ۱۰۰ میکرو لیتری دقیق. سمپلر ۸ کاناله با قابلیت پیپتینگ ۵۰ تا ۱۰۰ میکرو لیتر 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 $1 \mu S/cm$
۲. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.
۳. کاغذ جاذب رطوبت
۴. دستگاه واکس اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر ۸ کاناله یا سرنگ که قادر به ریختن ۳۵۰ میکرو لیتر 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 بر روی جعبه کیت به شرط نگهداری در دمای یادشده پایدار هستند. هرگز فراتر از تاریخ انقضاء مندرج بر روی 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 را باید بی رنگ باشد. وجود رنگ آبی در این محلول نشان از خرابی و آلودگی آن دارد و باید دور ریخته شود.

IVD-REF: PS - HCG.R	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در سنجش تشخیص و تشخیص آوری	کیت الایزا HCG-Rapid
Ver. No: 07		HCG-Rapid ELISA KIT

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 -20°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 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 فرا گرفته اید. همواره از ویرایش معتبر و به روز دستورالعمل که همراه کیت بسته بندی شده است، استفاده کنید.
۴. کلیه جوانب ایمنی در اجرای 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)" تألیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش ۱۳۹۳ مراجعه نمایید.

IVD-REF: PS - HCG.R	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الایزا HCG-Rapid
Ver. No: 07		HCG-Rapid ELISA KIT

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 **(HBsAg)B**، منفی گزارش شده اند، ولی از آنجایی که هیچ آزمایشی نمی تواند به طور کامل ایمنی یک نمونه با منشأ 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.

۹. این کیت به روش دستی (غیر دستگاهی) می باشد، برای انجام تست با روش دستگاهی با کارشناسان فنی این شرکت تماس حاصل نمایید.

آماده سازی معرف ها:

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

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.

IVD-REF: PS - HCG.R	 پیشگامان سنجش آزمایشگاه در سبب تشخیص و تشخیص و تشخیص	کیت الایزا HCG-Rapid
Ver. No: 07		HCG-Rapid ELISA KIT

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 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 استرپ نمونه (حداکثر ۲۴ نمونه) را مورد آزمایش 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. صورت وجود حباب با ضربه آهسته به پلیت از محیط خارج شوند.

۱۴. هر نوع نمونه یا ماده کنترلی که حاوی سدیم آزاید یا تیمورسال باشد، با این کیت سازگار نبوده و آزمایش بر روی 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.

IVD-REF: PS - HCG.R	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص و کنترل کیفیت	کیت الایزا HCG-Rapid
Ver. No: 07		HCG-Rapid ELISA KIT

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 (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 رطوبت گیر تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمایید.

- بهتر است برای شستشو از دستگاه های اتوماتیک و اشرفی 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°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 ۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید.

۹- ۱۰۰ 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 نمایید (در صورت امکان از طول موج ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید).

محاسبه نتایج:

۱. با استفاده از میانگین جذب نوری استاندارد ها بر روی محور عمودی (محور Y) و غلظت مشخص آنها بر روی محور افقی (محور X) بر روی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد را از طریق ترسیم خطوطی 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.

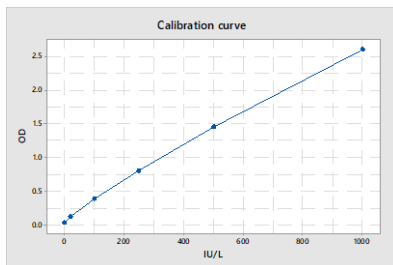
IVD-REF: PS - HCG.R	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در سنجش‌های تشخیص و کنترل کیفی	کیت الایز HCG-Rapid
Ver. No: 07		HCG-Rapid ELISA KIT

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 ایستاتیس 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	0.800	250
4	1.450	500
5	2.600	1000



کنترل کیفی:

در هر کیت یک نمونه کنترل وجود دارد که مقادیر موردانتظار برای آن بر روی 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.

IVD-REF: PS - HCG.R	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الایزا HCG-Rapid
Ver. No: 07		HCG-Rapid ELISA KIT

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 غیربائسه (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 در صورت 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:

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

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.

IVD-REF: PS - HCG.R	 پیشگامان سنجش آزمایشگاه در سبب تشخیص و مشاوره	کیت الایزا HCG-Rapid
Ver. No: 07		HCG-Rapid ELISA KIT

به طور خلاصه حد بلانک تحت عنوان مقدار صدک ۹۵ام (95th percentile) از ۶۰ بار اندازه گیری بر روی نمونه شاهد (استاندارد صفر) طی چندین ران بدست آمد. حد بلانک معادل غلظتی در نظر 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 ($n=20 \times 3=60$) با محتوای **hCG** بین **1-2 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 بالا معادل **1.0 IU/L** تعیین گردید.

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

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

۲- دقت (Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت **hCG** شرکت پیشگامان سنجش ایستاتیس 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 روز کاری، 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 ($2 \times 3 \times 10$). نتایج با روش آماری **Fully nested ANOVA** تحلیل گردید: خلاصه نتایج در جدول زیر آورده شده است:

۳- اختصاصیت (Specificity):

IVD-REF: PS - HCG.R	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در سنجش تشخیص و تشخیص ژنتیکی	کیت الایزا HCG-Rapid
Ver. No: 07		HCG-Rapid ELISA KIT

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 ایستایس 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:

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

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 گرای متداول بر روی کیت سنجش hCG-Rapid پیشگامان سنجش ایستایس بررسی گردید، طی این ارزیابی مشخص شده موگلوبین 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 و نتایج را با مقادیر موردانتظار که به صورت محاسباتی بدست آمده است، مقایسه کردیم و میزان بازایی و سوگرایی را در نقاط مختلف محاسبه کردیم، که نتایج در جدول زیر خلاصه شده است.

IVD-REF: PS - HCG.R	 پیشگامان سنجش وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی	HCG-Rapid کیت الایزا
Ver. No: 07		HCG-Rapid ELISA KIT

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 در تشخیص مقدار افزوده شده از طریق رابطه زیر محاسبه گردید:

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

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

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

IVD-REF: PS - HCG.R	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص و غربالگری	HCG-Rapid کیت الایزا
Ver. No: 07		HCG-Rapid ELISA KIT

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%

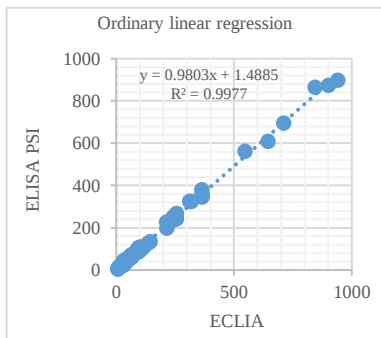
۵-۲- ارزیابی مقایسه ای (Method comparison)

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:

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

$$r = 0.9988$$

$$r^2 = 0.9967$$



۶- پدیده

IVD-REF: PS - HCG.R	 پیشگامان سنجش ریشه‌گذاری در سیستم‌های تشخیص و اندازه‌گیری	کیت الایزا HCG-Rapid
Ver. No: 07		HCG-Rapid ELISA KIT

در این کیت پدیده هوک تا غلظت **100000 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. McGraw 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

IVD-REF: PS - HCG.R	 پیشگامان سنجش وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی	کیت الایزا HCG-Rapid
Ver. No: 07		HCG-Rapid ELISA KIT

نوع مشکل	علت مشکل	راه حل
پایین بودن OD استانداردها و نمونه ها	افت و یا آلودگی کونزوگه	تکرار تست با کونزوگه 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. ۴. توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود.

IVD-REF: PS - HCG.R	 پیشگامان سنـجـش روانشناسی و مشاوره روانشناسی و روانشناسی	کیت الایزا HCG-Rapid
Ver. No: 07		HCG-Rapid ELISA KIT

۱. PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید.	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer.	
۲. پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.	شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	
تکرار تست با استاندارد های جدید	آلودگی استاندارد صفر	بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD
استفاده از محلول رنگزا جدید	آلودگی محلول رنگزا	
۱. عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید.	آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نامناسب	
۲. تمام سوزن های دستگاه وشر را چک کنید.		
۱. تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید.	طول موج نامناسب در خوانش	
۲. طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.		
۳. از فیلتر ۰.۶۳ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید.		عدم تولید رنگ در چاهک ها
تکرار تست با محلول Stop جدید	آلودگی محلول Stop	
تکرار تست با مواد همان کیت	استفاده از مواد سایر کیت ها	
تکرار تست	انجام نشدن مرحله ای از تست	
تکرار تست با محلول رنگزا جدید	آلودگی محلول رنگزا	
تکرار تست با محلول کونژوگه جدید	آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید	
۱. استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف	پیتینگ نامناسب، گرفتگی	
۲. از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید	لوله داخلی سمپلر بواسطه آلودگی	
۳. توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد.		

IVD-REF: PS - HCG.R	 پیشگامان سلامت وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی	کیت الایزا HCG-Rapid
Ver. No: 07		HCG-Rapid ELISA KIT

عدم تکرار پذیری مناسب	۴. توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نشود. ۵. توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد. ۶. کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلر ها	
	فاصله زمانی بین اضافه کردن استاندارد ها و نمونه نباید بیشتر از ۱۰ دقیقه باشد. در این صورت نتایج قابل اعتماد نیست.	طولانی شدن زمان انجام تست
	پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید.	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد
	پیپتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.	باقی ماندن کونژوگه در لبه چاهکها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک ها
	در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک ها نباشد.	وجود حباب در چاهک ها
	کف چاهکها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید. قبل از استفاده، ویال محلول ها را به آرامی تکان دهید.	کثیف بودن کف چاهکها مخلوط نشدن محلول های کیت