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

معرف	48 تستی	96 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
کالیبراتور2-6 (20 IU/L، 100، 250، 500، 1000) 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 1 به 20 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 1 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 10 دقیقه رنگ آبی بوجود می آید. با افزودن محلول توقف تولید رنگ متوقف می گردد که شدت جذب نوری در 450 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 :

1. سمپلرهای 50 و 100 میکرولیتری دقیق. سمپلر 8 کاناله با قابلیت پیپتینگ 50 تا 100 میکرولیتر و یا دیسپنسر اتوماتیک، اگرچه ضروری نیست ولی باعث بهبود قابل توجه تکرارپذیری و صحت نتایج می گردد.
1. آب مقطر با هدایت کمتر از **1 µS/cm**
2. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر 450 نانومتری و در صورت امکان 630 نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.
3. کاغذ رطوبت گیر
4. دستگاه واشر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر 8 کاناله یا سرنگ که قادر به ریختن 350 میکرولیتر محلول شستشو باشد.

نگهداری کیت :

1. کیت پس از تحویل باید در دمای 8-2 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.***
2. 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.
3. از انجماد کیت یا اجزاء کیت خودداری نمایید.
4. 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.
5. محلول شستشو باید روزانه و تازه تهیه شود و در همان روز تهیه مصرف شود.
6. تغییر در خصوصیات فیزیکی معرف ها نظیر وجود ذرات معلق در آنها اغلب حاکی از آلودگی و خرابی معرف ها می باشد.

7. 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.
8. کیت های باز شده اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شوند، حداکثر به مدت 8 هفته پایدار خواهند بود.
9. اجزاء کیت ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابه جایی درب معرف ها جلوگیری شود.
10. 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:

1. سرم یا پلاسمای **EDTA** نمونه مناسب برای این آزمایش است.
2. از نمونه های با کدورت بالا، همولیز یا لیپمیک ترجیحاً استفاده نشود.
3. در صورتی که انجام آزمایش در همان روز جمع آوری نمونه امکان پذیر نباشد، نمونه ها را می توان برای مدت 48 ساعت در دمای 2 تا 8 درجه سانتیگراد نگه داری کرد. برای مدت طولانی تر نمونه ها باید در**20°C**- سانتیگراد نگهداری شود.
4. 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

1. کیت فقط برای تشخیص آزمایشگاهی کاربرد دارد.
2. 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.
3. 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
4. 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 1393 مراجعه نمایید.

5. 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.

6. 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.

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

8. 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 1394 مراجعه نمایید.

آماده سازی معرف ها:

1. همه معرف ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (27-20 درجه سانتیگراد) برسند.
2. تهیه محلول شستشو: برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ **(20X)** را با 19 حجم آب مقطر رقیق نمائید.

نکات مهم در انجام تست:

1. فرایند شستشو از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. شستشوی ناکافی باعث عدم جداشدن پیوندهای غیراختصاصی و جذب نوری زمینه (**Background**) می گردد.
2. کیفیت آب مقطر مصرفی در کیفیت محلول شستشو و جدا کردن پیوندهای غیراختصاصی اهمیت زیادی دارد.
3. 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.
4. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.
5. دمای مطلوب محیط آزمایشگاه برای آزمایش های الایزا 20 تا 27 درجه سانتیگراد می باشد.

6. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش به خوبی مخلوط نمایید.
7. 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.
8. جهت پیپت کردن محلول سوبسترا-رنگ زا و محلول توقف از میکروپیپت های حاوی ***قطعات فلزی استفاده نکنید***.
9. زمان های انکوباسیون و دمای انکوباسیون را با دقت رعایت کنید.
10. 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 5 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 2-3 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.
11. در هر بار انجام آزمایش منحنی کالیبراسیون را مجدد ترسیم نموده و برای محاسبه نتایج از منحنی ذخیره شده استفاده نکنید.
12. مراحل آزمایش را بدون وقفه انجام دهید. وقفه بین مراحل باعث نتایج کاذب می گردد.
13. 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.
14. 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:

1- تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار را بصورت 2 تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده نمگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.
2- 25 میکرولیتر از استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار به داخل هر چاهک بریزید.
3- 100 میکرولیتر از بافر سنجش، به تمام چاهک ها اضافه کنید.

4- پلیت را به مدت 10 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 20 دقیقه در دمای اتاق (**20-25°C**) انکوبه کنید.

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

- برای شستشوی چاهک ها، ابتدا 350 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 5 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.

6- 100 میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی ، به تمام چاهک ها اضافه کنید، درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا به مدت 20 دقیقه در دمای اتاق (**20-25°C**) انکوبه کنید.

7- طبق دستورالعمل مرحله 5 چاهک ها را شستشو دهید.

8- 100 میکرولیتر از سوبسترا-رنگ زا آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

9-50 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 10 دقیقه جذب نوری هر چاهک را در طول موج 450 نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول موج 630 نانومتر بعنوان فیلتر مرجع استفاده کنید).

محاسبه نتایج:

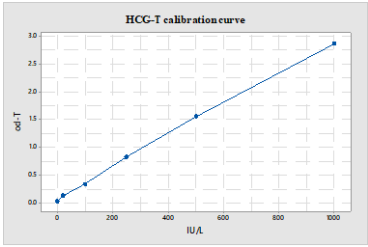
1. با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها برروی محور عمودی (محور **Y**) و غلظت مشخص آنها برروی محور افقی (محور **X**) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد را از طریق ترسیم خطوطی که از که از تمامی نقاط تلاقی عبور کرده باشد، ترسیم کنید.
2. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور **Y**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

3. 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 2/5٪ و 97/5٪ مرکزی با استفاده از کیت **hCG** الایزا شرکت پیشگامان نتایج زیر برای زنان بالغ غیربائسه 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

1- 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 95 ام (**95th percentile**) از 60 بار اندازه گیری برروی نمونه شاهد(استاندارد صفر) طی چندین ران بدست آمد. حد بلانک معادل غلظتی درنظر گرفته شد که 95٪ از 60 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 20 اندازه گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم(**n**=20×3=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 یادشده مبنای تعیین حد آشکارسازی قرار گرفت. از رابطه زیر حد آشکارسازی پس از گرد کردن روبه بالامعادل **1.0 IU/L** تعیین گردید.

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

2- دقت(Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت **hCG** شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس و 3 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 10 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(2×3×3×10). 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

3- 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 10 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.

4- خطی بودن(Linearity):

به منظور ارزیابی خطی بودن یک نمونه با غلظت hCG اولیه 873 IU/L را با نمونه دیگری با غلظت 25 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.

5- درستی(Trueness):

5-1- 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 10 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%

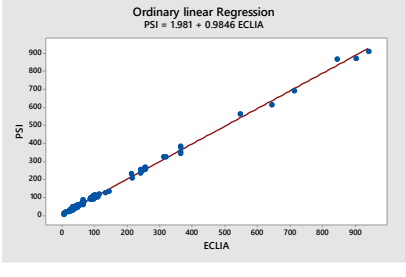
5-2- ارزیابی مقایسه ای(Method comparison)

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:

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

$$r = 0.9988$$

$$r^2 = 0.9976$$



6- 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	1.دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید. 2.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	PH.1 آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. 2.پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	1.پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. 2.پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.
	طول موج خوانش نامناسب (405 nm بجای 450nm)	1.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. 2.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
صحیح نبودن نمودار استانداردها	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید.
	پیپتینگ نامناسب	1.استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف 2.از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید. 3.توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد.

		4.توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود.
	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	1 . PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. 2.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	1.عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. 2. تمام سوزن های دستگاه واشر را چک کنید.
	طول موج نامناسب در خوانش	1.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. 2.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. 3.از فیلتر 630 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

عدم تکرار پذیری مناسب	پیپتینگ نامناسب، گرفتگی لوله داخلی سمپلر بواسطه آلودگی	1. استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف 2. از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید 3. توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. 4. توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نشود. 5. توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد. 6. کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلر ها
	طولانی شدن زمان انجام تست	فاصله زمانی بین اضافه کردن استاندارد ها و نمونه نباید بیشتر از 10 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.