FSH ELISA KIT	PISHGAMAN SANJESH ISATIS	کیت الایزا FSH

کاربرد:

کیت **FSH ELISA Kit** شرکت پیشگامان سنجش برای اندازه گیری کمی هورمون محرکه فولیکولی یا **Follicle stimulating hormone** در سرم یا پلاسما طراحی گردیده است.

مقدمه :

هورمون محرکه فولیکولی(**FSH**) همراه با لوتروپین یا هورمون لوتئال(**Luteinizing hormone**) به خانواده گونادوتروپین ها تعلق دارند. **FSH** و **LH** تنظیم و تحریک رشد عملکرد گونادها (تخمدان ها و بیضه ها) را به صورت هم افزایی برعهده دارند.

همانند **LH**، **TSH** و **hCG** ، **FSH** نیز گلیکوپروتئینی متشکل از دو زیر واحد(زنجیره های α و **β**) است و وزن مولکولی آن تقریباً ۳۲ کیلودالتون است.

در زنان گونادوتروپین ها درون مدار تنظیمی هیپوفیز- تخمدان به منظور کنترل چرخه قاعدگی عمل می کنند. سطح هورمون در گردش به وسیله هورمون های استروئیدی از طریق پس خوراند منفی به هیپوتالاموس، کنتر ل می شود. در تخمدان **FSH** همراه با **LH** رشد و بلوغ فولیکول ها و از این طریق بیوسنتز استروژن ها را در فولیکول ها تحریک می کند.

سطح **FSH** نقطه اوجی را در نیمه چرخه قاعدگی از خود نشان می دهد، هر چند این مقدار حداکثری نسبت به **LH** ،کم تر بارز است. در نیمه دوم چرخه قاعدگی یا فاز لوتئال به ویژه در اثر سازوکار پس خوراند منفی ناشی از افزایش ترشح استرادیول ترشح **FSH** رفته رفته کاهش می یابد. به دلیل تغییر در عملکرد تخمدان و کاهش ترشح استرادیول طی یائسگی ، شاهد افزایش چشم گیر مقدار **FSH** طی این دوران خواهیم بود.

در مردان **FSH** باعث القاء اسپرم سازی می گردد. تعیین غلظت **FSH** به همراه **LH** برای یافتن علت نقصان عملکرد سیستم هیپوتالاموس-هیپوفیز-گونادها به کار می رود. اندازه گیری **FSH** و **LH** در موارد بیماری های مادرزادی با ناهنجاری های کروموزومی، تخمدان پلی سیستیک، یافتن علت قطع قاعدگی و نشانگان یائسگی، افتراق کم کاری اولیه گنادها از کم کاری ثانویه ناشی از کم کاری هیپوفیز در زنان کاربرد دارد. کاهش سطح گونادوتروپین ها درمردان در آزوسپرمی(کاهش تعداد اسپرم ها) دیده شده است.

یک روش صحیح ارزیابی عملکرد تخمدان ها، آزمایش ذخیره تخمدانی است. یک روش متداول برای این ارزیابی، آزمایش چالش کلومیفن (**Clomiphene Challenge Test or CCT**) می باشد. طی این ارزیابی در روزهای پنجم تا نهم چرخه قاعدگی، به بیمار کلومیفن داده می شود. انتظار می رود سطح **FSH** حدود روز دهم به میزان قابل ملاحظه ای افزایش، سپس کاهش یابد. افزایش پایدار **FSH** بر کاهش ذخیره تخمدانی و کاهش احتمال حاملگی دلالت دارد.

اساس آزمایش :

کیت سنجش **FSH** شرکت تولیدی، تحقیقاتی پیشگامان سنجش ایساتیس برمبنای اصول الایزا نوع ساندویچ 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 معرف کونژوگه که حاوی دو نوع آنتی بادی علیه **FSH** یکی کونژوگه با بیوتین و دیگری کونژوگه با آنزیم **HRP** است و **FSH** را از دو جایگاه متفاوت شناسایی می کنند به چاهک های پوشیده شده از استرپتاویدین اضافه می شوند. **FSH** 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 شود. سپس اجزای اتصال نایافته طی شستشو از محیط خارج و با افزودن محلول سوبسترا - رنگزا و انکوباسیون بمدت ۱۵ دقیقه رنگ آبی بوجود می آید. با افزودن محلول توقف تولید رنگ متوقف می گردد که شدت جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری می شود. شدت رنگ با مقدار **FSH**موجود در سرم نسبت مستقیم دارد .

معرف ها :

FSH ELISA KIT	PISHGAMAN SANJESH ISATIS	کیت الایزا FSH

آماده سازی	۹۶ تستی	۴۸ تستی	معرف
آماده مصرف	1×96 wells	1×48 wells	پلیت پوشیده شده با استرپتاویدین
آماده مصرف	6 ×0.5 mL	6 ×0.5 mL	کالیبراتور۱-۶ (۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ mIU/mL) در بافر، به همراه نگهدارنده کالیبره شده علیه ماده مرجع WHO 2nd ISO 84/552
آماده مصرف	1 ×0.5 mL	1 ×0.5 mL	نمونهٔ کنترل در بافر سازگار با سرم انسانی همراه با نگهدارنده(بازه قابل قبول سرم کنترل برروی برچسب قید شده است)
آماده مصرف	1 ×12.0 mL	1 ×6.0 mL	کونژوگه(قرمز رنگ)
به نسبت ۱ به ۲۰ با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید	1 ×30 mL	1 ×30 mL	محلول شستشو غلیظ
آماده مصرف	1 ×12.0 mL	1 ×6.0 mL	محلول سوبسترا-رنگ زا(تترامتیل بنزدین و آب اکسیژنه)
آماده مصرف	1 ×6.0 mL	1 ×6.0 mL	محلول توقف(اسید کلریدریک۱ مولار)

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

۱. سمپلرهای ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری دقیق. سمپلر ۸ کاناله با قابلیت پیپتینگ ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر و یا دیسپنسر اتوماتیک، اگرچه ضروری نیست ولی باعث بهبود قابل توجه تکرارپذیری و صحت نتایج می گردد.
۲. آب مقطر با هدایت الکتریکی مطلوب کم تر از **$1\mu s/cm^3$**
۳. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.
۴. کاغذ جاذب رطوبت
۵. دستگاه واشر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر ۸ کاناله یا سرنگ که قادر به ریختن ۳۵۰ میکرولیتر محلول واش 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 نمگیر 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 جابه جایی درب معرف ها جلوگیری شود.

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

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

۱. سرم یا پلاسمای **EDTA** نمونه مناسب برای این آزمایش است.
۲. از نمونه های با کدورت بالا، همولیز یا لیپمیک ترجیحاً استفاده نشود.
۳. در صورتی که انجام آزمایش در همان روز جمع آوری نمونه امکان پذیر نباشد، نمونه ها را می توان برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگه داری کرد. برای مدت طولانی تر نمونه ها باید در**C**°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 آزمایشگاهی کاربرد دارد.
۲. کلیه معرف های کیت برای سنجش مستقیم FSH سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده اند و برای سنجش FSH 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 سولفوریک 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 سانتیگراد) برسند.
۲. تهیه محلول شستشو: برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ **(20X)** را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمائید.

نکات مهم در انجام تست:

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

۲. کیفیت آب مقطر مصرفی در کیفیت محلول شستشو و جدا کردن پیوندهای غیراختصاصی اهمیت زیادی دارد.
۳. در مواردی که مقدارFSH نمونه بیش از100 mIU/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 مورداستفاده قرار گیرد.
۸. جهت پیپت کردن محلول سوبسترا-رنگ زا و محلول توقف از میکروپیپت های حاوی ***قطعات فلزی استفاده نکنید***.
۹. زمان های انکوباسیون و دمای انکوباسیون را با دقت رعایت کنید.
۱۰. در کیت FSH شرکت پیشگامان سنجش 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 از۵ 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 ۵ دقیقه به طول بیانجامد، لذا توصیه می شود، اگر کل پلیت هم زمان ران می شود، برای پرهیز از خطای ناشی از اختلاف زمانی، از تجهیزاتی نظیر دیسپنسر اتوماتیک یا سمپلر هشت کاناله برای ریختن معرف ها استفاده شود یا بیش از شش استریپ در هر بار ران نشود.
۱۱. در هر بار انجام آزمایش منحنی کالیبراسیون را مجدد ترسیم نموده و برای محاسبه نتایج از منحنی ذخیره شده استفاده نکنید.
۱۲. مراحل آزمایش را بدون وقفه انجام دهید. وقفه بین مراحل آثار زیانباری بر نتایج نهایی دارد.
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 مناسب چاهک های پوشیده شده از استرپتاویدین، برای استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار را بصورت دوتایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده نمگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.
۲- ۲۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار به داخل هر چاهک بریزید.
۳- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کاری کونژوگه ، به تمام چاهک ها اضافه کنید.
۴- پلیت را بمدت ۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها به خوبی مخلوط شوند. سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا بمدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق(۲۰-۲۷°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 جاذب الرطوبه 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 سوبسترا-رنگ زا آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

۸. ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همان ترتیبی که محلول سوبسترا- رنگ زا 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 تمامی نقاط تلاقی عبور کرده باشد،ترسیم کنید.

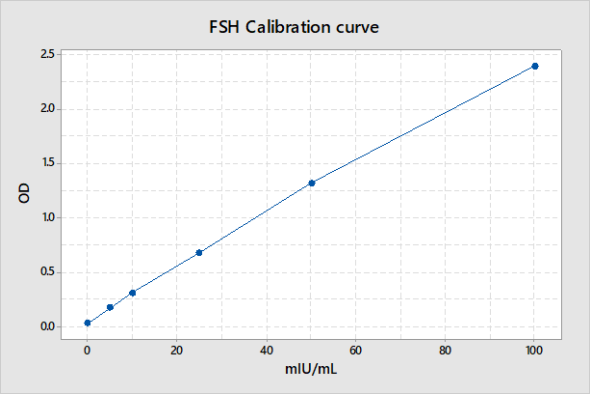
۲. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور **Y** جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور **X** وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

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 **FSH** شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس از مد 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	mIU/mL
1	**0.028**	**0.0**
2	**0.165**	**5.0**
3	**0.302**	**10**
4	**0.674**	**25**
5	**1.312**	**50**
6	**2.387**	**100**



کنترل کیفی:

در هر کیت یک نمونه کنترل وجود دارد که مقادیر موردانتظار برای هر یک برروی برچسب ویال درج شده است. علاوه بر کنترل های 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 :

در یک بررسی که برروی سرم تعدادی از مراجعه کنندگان(سنین ۲۰-۵۵ سال) چندین آزمایشگاه مختلف در سطح استان تهران به عمل آمد ، دامنه مرجع زیر برای گروه های مختلف سنی و جنسی براساس درون یابی دامنه بین ٪۲/۵ و ٪۹۷/۵ مرکزی با استفاده از کیت **FSH**

الایزا شرکت پیشگامان 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:

مرحله قاعدگی/ گروه	تعداد	**2.5th -97.5th percentile**
مرحله فولیکولار	**110**	**2.3-9.2**
نیمه دوره قاعدگی	**45**	**7-18.6**
مرحله لوتئال	**96**	**1.5-6.0**
یائسگی	**110**	**20-100**
مردان	**115**	**1.0-12**
کودکان یک تا ده سال	**82**	**0.6-6.0**

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 شاهد(**LoB**) معادل غلظتی درنظر گرفته شد که ۹۵٪ از ۶۰ نتیجه اندازه گیری های تکراری مقداری کمتر از آن بدست دهد، مقدار حد شاهد **0.013 mIU/mL** بدست آمد. برای تعیین حد آشکارسازی ۲۰ اندازه گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم(**n**=۲۰×۳=۶۰) با محتوای **FSH** کمتر از**0.20 mIU/mL** که مقدار **FSH** 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 mIU/mL** تعیین گردید.

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

۲- دقت(Precission):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت **FSH** شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس و ۲ انباشته سرمی تهیه شده از نمونه های بیمار و یک نمونه کنترل تجاری در سه نقطه نقاط مختلف بازه اندازه گیریمطابق 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(۲×۳×۳×۳×۱۰). نتایج با روش آماری **Fully nested ANOVA** تحلیل گردید: خلاصه نتایج در جدول زیر آورده شده است:

Sample Description	**Mean (mIU/mL)**	**Repeatability**		**Within-Laboratory Precision**	
		SD	**%CV**	**SD**	**%CV**
Patient Pool	**6.01**	**0.28**	**4.66**	**0.37**	**6.16**
L2-Biorad	**19.62**	**0.91**	**4.64**	**0.94**	**4.79**
Patient Pool	**40.6**	**1.76**	**4.33**	**2.42**	**5.96**

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 **FSH** پیشگامان سنجش ایساتیس با سایر هورمون های گلیکوپروتئینی **TSH**، **LH** و **hCG** 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 **FSH** 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 **FSH** 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(٪)
TSH	**500 µIU/ml**	**0.05**
LH	**500 mIU/ml**	**0.16**
hCG	**25000 IU/L**	**0. 08**

در این کیت هموگلوبین تا **50 mg/mL**، بیلیروبین تا **20 mg/dL** و تری گلیسریدها تا **1000 mg/mL** تأثیری بر سنجش ندارد.

٤- خطی بودن(Linearity):

به منظور ارزیابی خطی بودن یک نمونه با غلظت اولیه **83 mIU/mL** را با نمونه دیگری با غلظت **2 mIU/mL** به نسبت های مختلف با یکدیگر رقیق کردیم و رقت های مختلف را به صورت مضاعف اندازه گیری ونتایج را با مقادیر موردانتظار که از ضرب غلظت اولیه در ضریب رقت بدست آمده بود مقایسه کردیم و میزان بازیابی و سوگرایی را در نقاط مختلف محاسبه کردیم، نتایج در جدول زیر خلاصه شده است.

No	Ratio	Expected (µIU/mL)	Rep 1 (µIU/mL)	Rep 2 (µIU/mL)	recovery%	%Bias
1	1	83	83	83	NA	NA
2	0.9	74.9	73.2	70.4	95.86%	-4.14%
3	0.8	66.8	64.5	68	99.18%	-0.82%
4	0.7	58.7	57.2	61.25	100.89%	0.89%
5	0.6	50.6	48.7	47.9	95.45%	-4.55%
6	0.5	42.5	40.7	39	93.76%	-6.24%
7	0.4	34.4	32.7	31.5	93.31%	-6.69%
8	0.3	26.3	26.5	27.4	102.47%	2.47%
9	0.2	18.2	17.7	18.6	99.73%	-0.27%
10	0.1	10.1	9.4	11.3	102.48%	2.48%
11	0	2.0	2	2	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 **FSH** انجام گرفت.

به طور خلاصه نمونه اولیه به دو بخش مساوی تقسیم و به یکی حجمی از سرم یا بالاترین استاندارد حاوی مقدار مشخص **FSH** و به دیگری همان حجم استاندارد صفر به گونه ای که ماتریکس نمونه بیش از ۱۰ درصد تغییر نکند افزوده شد. و سپس بررسی توانمندی سیستم اندازه گیری درتشخیص مقدار افزوده شده از طریق رابطه زیر محاسبه گردید

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

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

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

در ارزیابی پیش رو از بالاترین استاندارد کیت به عنوان منبع آنالیت استفاده شد و مقدار بازیابی در ۶ سطح غلظتی ارزیابی شد. نتایج این ارزیابی در جدول زیر خلاصه شده است:

Sam. No	Base Conc. mIU/mL	Added Analyte	Rep 1 mIU/mL	Rep 2 mIU/mL	Bias%	Recovery%
1	**47.35**	**10 mIU/mL**	**56.7**	**59.9**	**1.66%**	109.50%
2	**34.1**		**45.2**	**43.7**	**0.79%**	103.50%
3	**12.25**		**22.3**	**23.3**	**2.47%**	105.50%
4	**1.865**		**11.8**	**12.7**	**3.24%**	103.85%
5	**59.4**		**69**	**70.7**	**0.65%**	104.50%
6	**6.9**		**16.7**	**17.7**	**1.78%**	103.00%

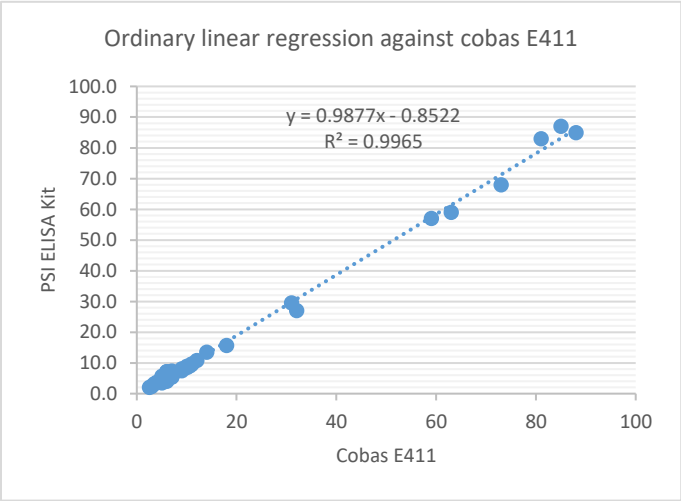
۲-۵- ارزیابی مقایسه ای(Method comparison)

ارزیابی مقایسه ای بین نتایج اندازه گیری کیت سنجش **FSH** سرم شرکت پیشگامان و روش **ECLIA-Cobas E411-Roche diagnostic** (**n=84 range:2.5-88 mIU/mL**) انجام و مطابق با راهنمای **EP 09-A2** مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(**CLSI**) به روش رگرسیون خطی تحلیل گردید. در این ارزیابی نتایج کیت پیشگامان برروی محور عمودی(محور **y**ها) و نتایج روش**ECLIA** برروی محور افقی(محور **x**ها) مشخص و نمودار رگرسیون خطی ترسیم گردید. خلاصه نتایج و نمودار رگرسیون خطی(**Linear regression**) در ادامه آورده شده است:

$$PSI\ ELISA = 0.9877\ ECLIA - 0.8522$$

$$r = 0.9982$$

$$r^2 = 0.9965$$



٦- پدیده هوک:

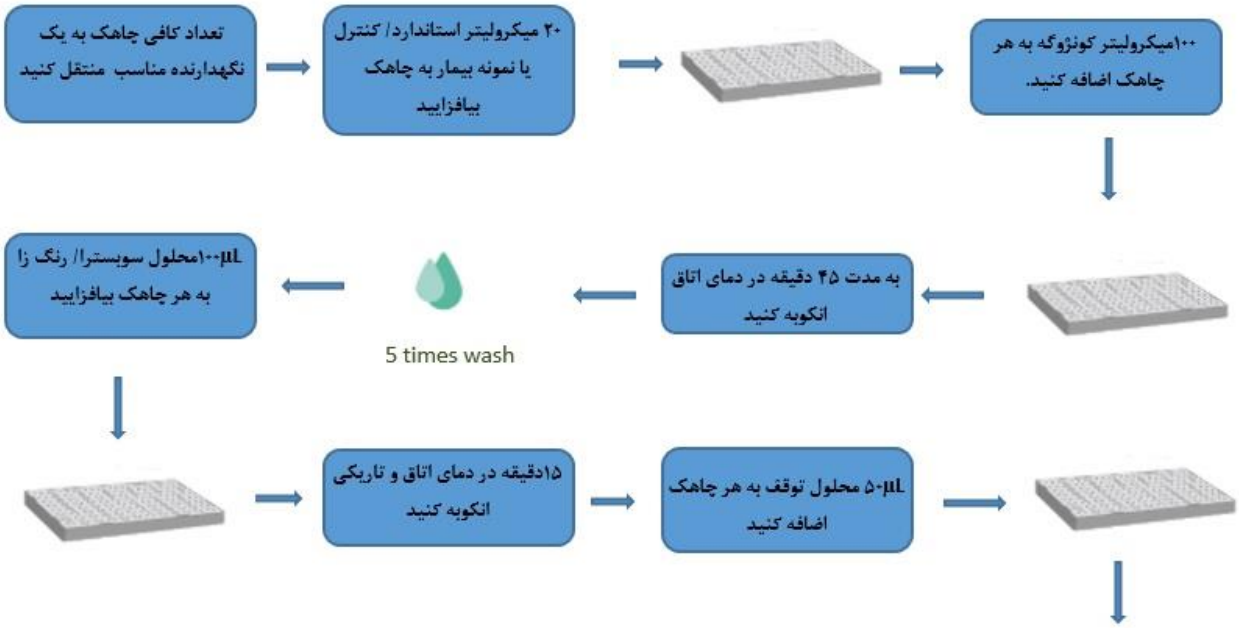
در این کیت پدیده هوک تا غلظت **2000 mIU/mL** مشاهده نگردید.

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. **Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias,derived from intra- and inter-individual biologic variation, https://www.westgard.com/biodatabase1.htm**
5. **Pagana K.D. et al. (2018). Mosby's Manual of diagnostic and Laboratory tests.6th ed. Elsevier Inc.**
6. **Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics.6th ed. Elsevier Inc.**
7. **Royal college of pathologists of Australasia. https://www.datainnovations.com/allowable-total-error-table**
8. **Scott M.G. et al. (1989). Hormonal evaluation of female infertility and reproductive disorders. Clin. Chem. 1989. 35:620-30**

FSH ELISA KIT	PISHGAMAN SANJESH ISATIS	کیت الایزا FSH

خلاصه روش انجام آزمایش



درطول موج
۴۵۰/۶۳۰ نانومتر
قرائت کنید

FSH ELISA KIT	PISHGAMAN	کیت الایزا FSH

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	دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید 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** آب مقطر را چک کنید و تست را با **Wash Buffer** جدید تکرار کنید پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید
	طول موج خوانش نامناسب (**nm** ۴۰۵ بجای **nm** ۴۵۰)	تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید طول موج دستگاه را دوباره چک کنید
صحیح نبودن نمودار استانداردها	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید
	پیپتینگ نامناسب	استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد 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	**PH** آب مقطر را چک کنید و تست را با **Wash Buffer** جدید تکرار کنید 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	عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با **Wash Buffer** جدید تکرار کنید تمام سوزن های دستگاه واشر را چک کنید
	طول موج نامناسب در خوانش	تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید طول موج دستگاه را دوباره چک کنید 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	استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید

		توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نشود توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد 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