

| | | |
|-------------------|---|----------------|
| IVD-REF: PS - FSH |  پیشگامان سنجش پخشگاه‌های تشخیصی و تست‌های آوری | کیت الایزا FSH |
| Ver. No: 04 | | FSH ELISA KIT |

| آماده سازی | 96 تستی | 48 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 | کالیبراتور 1-6 (0، 5، 10، 25، 50، 100 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 | نمونه کنترل در بافر سازگار با سرم انسانی همراه با نگهدارنده (بازه قابل قبول سرم کنترل بر روی برجسب قید شده است) |
| آماده مصرف | 1 ×12.0 mL | 1 ×6.0 mL | کونزوگه (قرمز رنگ) |
| به نسبت 1 به 20 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 ز(انترامتیل بنزدین و آب اکسیژنه) |
| آماده مصرف | 1 ×6.0 mL | 1 ×6.0 mL | محلول توقف (اسید کلریدریک 1 مولار) |

| | | |
|-------------------|--|----------------|
| IVD-REF: PS - FSH |  <p>پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی</p> | کیت الایزا FSH |
| Ver. No: 04 | | FSH ELISA KIT |

کاربرد:

کیت **FSH ELISA Kit** شرکت پیشگامان سنجش ایستاس 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 لوتال (**Luteinizing hormone**) به خانواده گونادوتروپین ها تعلق دارند. **FSH** و **LH** تنظیم و تحریک رشد عملکرد گونادها (تخمندان ها و بیضه ها) را به صورت هم افزایی برعهده دارند.

همانند **LH**، **TSH**، **hCG** و **FSH** نیز گلیکوپروتئینی متشکل از دو زیر واحد (زنجیره های α و β) است و وزن ملکولی آن تقریباً 32 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 خوردن منفی به هیپوتالاموس، کنترل 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 بیشینه ای را در نیمه چرخه قاعدگی از خود نشان می دهد، هر چند این مقدار حداکثری نسبت به **LH**، کمتر بارز است. در نیمه دوم چرخه قاعدگی یا فاز لوتال به ویژه در اثر سازوکار پس خوردن 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 گنادهای از کم کاری ثانویه ناشی از کم کاری هیپوفیز در زنان کاربرد دارد. کاهش سطح گونادوتروپین ها در مردان در آروسپرمی (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

| | | |
|-------------------|---|----------------|
| IVD-REF: PS - FSH |  پیشگامان سنجش پیشگامان در زمینه سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی | کیت الایزا FSH |
| Ver. No: 04 | | FSH ELISA KIT |

قابل ملاحظه ای افزایش، سپس کاهش باید. افزایش پایدار **FSH** بر کاهش ذخیره تخمدانی و کاهش احتمال حاملگی دلالت دارد.

اساس آزمایش :

مبنای کیت سنجش **FSH** شرکت تولیدی- تحقیقاتی پیشگامان سنجش ایساتیس بر پایه الایزا نوع ساندویچی می باشد. 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 کونزوگه که حاوی دو نوع آنتی بادی علیه **FSH** یکی کونزوگه با بیوتین و دیگری کونزوگه 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 یا کنترل یا نمونه بیمار بین دو آنتی بادی به حالت ساندویچ در آمده و مجموعه از طریق بیوتین به استرپتاویدین فاز جامد متصل می شود. سپس اجزای اتصال نایافته طی شستشو از محیط خارج و با افزودن محلول سوبسترا - رنگزا و انکوباسیون بمدت 15 دقیقه رنگ آبی بوجود می آید. با افزودن محلول متوقف گر، واکنش آنزیمی متوقف می گردد. شدت جذب نوری در 450 نانومتر اندازه گیری می شود. شدت رنگ با مقدار **FSH** موجود در سرم نسبت مستقیم دارد

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

1. سمپلهای 20، 50 و 100 میکرولیتری دقیق، سمپلر 8 کاناله با قابلیت پیپتینگ 50 تا 100 میکرولیتر و دیسپنسر اتوماتیک، اگرچه ضروری نیست ولی باعث بهبود قابل توجه تکرارپذیری و صحت نتایج می گردد.
2. آب مقطر با هدایت الکتریکی مطلوب کم تر از $1 \mu\text{s/cm}$
3. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر 450 نانومتری و در صورت امکان 630 نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.
4. کاغذ جاذب رطوبت
5. دستگاه و اشتر 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 2-8 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.
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.

| | | |
|-------------------|---|----------------|
| IVD-REF: PS - FSH |  پیشگامان سنجش پیشگامان در زمینه تشخیص و تست‌آوری | کیت الایزا FSH |
| Ver. No: 04 | | FSH ELISA KIT |

3. از انجماد کیت یا اجزاء کیت خودداری نمایید.
4. 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.
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 استاندارد است 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 - 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.

| | | |
|-------------------|--|----------------|
| IVD-REF: PS - FSH |  | کیت الایزا FSH |
| Ver. No: 04 | پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی | FSH ELISA KIT |

احتیاطات و هشدارها

1. کیت فقط برای تشخیص آزمایشگاهی کاربرد دارد.
2. 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.
3. 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.
4. 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)" 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 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 طور کامل 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 آزیدهای 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.

| | | |
|-------------------|---|----------------|
| IVD-REF: PS - FSH |  پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی | کیت الایزا FSH |
| Ver. No: 04 | | FSH ELISA KIT |

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 نمایید.

نکات مهم در انجام تست:

1. فرایند شستشو از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. شستشوی ناکافی باعث عدم جداسدن 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 FSH نمونه بیش از 100 mIU/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 بخوبی مخلوط نمایید.
7. بهتر است 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.
8. جهت پپیت کردن محلول سوبسترا-رنگ زا و محلول توقف از میکروپپیت های حاوی قطعات فلزی استفاده نکنید.

9. زمان های انکوباسیون و دمای انکوباسیون را با دقت رعایت کنید.
10. 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 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 پپیتینگ چاهک ها با محلول کونژوگه نباید بیشتر از 5 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.

| | | |
|-------------------|---|----------------|
| IVD-REF: PS - FSH |  پیشگامان سنجش | کیت الایزا FSH |
| Ver. No: 04 | پیشگامان سنجش <small>پیشگامان در زمینه تشخیص‌های و تست‌های آزمایشگاهی</small> | FSH ELISA KIT |

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 می‌گردد.

13. در کلیه مراحل انجام آزمایش و متعاقب هر مرحله پیپتینگ، چاهک‌ها 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 تیمورسال باشد، با این کیت سازگار نبوده و آزمایش بروی آنها ممکن است به حصول پاسخ‌های کاذب بیانجامد.

روش انجام آزمایش:

1- تعداد مناسب چاهک‌های پوشیده شده از استرپتاویدین، برای استانداردها، کنترل‌ها و نمونه‌های بیمار را بصورت دوتایی انتخاب کنید و مابقی چاهک‌ها را همراه ماده‌نمگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.

2- 20 میکرولیتر از استانداردها، کنترل‌ها و نمونه‌های بیمار به داخل هر چاهک بریزید.

3- 100 میکرولیتر از محلول کاری کوئوگه، به تمام چاهک‌ها اضافه کنید.

4- پلیت را بمدت 15 ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک‌ها به خوبی مخلوط شوند. سپس درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا بمدت 45 دقیقه در دمای اتاق (20-27°C) انکوبه کنید.

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

- برای شستشوی چاهک‌ها، ابتدا 350 میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک‌ها 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 چاهک‌ها را تخلیه نمایید.

- بهتر است برای شستشو از دستگاه‌های اتوماتیک‌واشر که قابل برنامه‌ریزی است استفاده نمایید. که در این صورت به دستورالعمل دستگاه شستشو مراجعه نمایید.

6- 100 میکرولیتر از سوپسترا-رنگ‌زا آماده مصرف به تمامی چاهک‌ها اضافه کنید و آنها را بمدت 15 دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید.

7- 50 میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش به همان ترتیبی که محلول سوپسترا-رنگ‌زا اضافه نمودید، به همه چاهک‌ها اضافه کنید. سپس حداکثر ظرف مدت 10 دقیقه جذب نوری هر چاهک را در طول موج 450

| | | |
|-------------------|---|---------------|
| IVD-REF: PS - FSH |  پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش تشخیصی و تست‌آوری | کیت الیزا FSH |
| Ver. No: 04 | | FSH ELISA KIT |

نانومتر با دستگاه الیزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول موج 630 نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید).

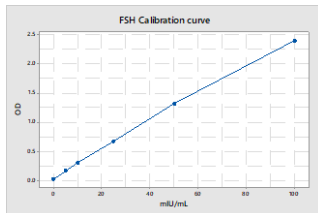
محاسبه نتایج:

- با استفاده از میانگین جذب نوری استاندارد‌ها 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.
- میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور **Y** جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی که 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.
- 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 ایستاسی 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 | mIU/mL | OD |
|-----|--------|-------|
| 1 | 0.0 | 0.028 |
| 2 | 5.0 | 0.165 |
| 3 | 10 | 0.302 |
| 4 | 25 | 0.674 |
| 5 | 50 | 1.312 |
| 6 | 100 | 2.387 |



| | | |
|-------------------|---|----------------|
| IVD-REF: PS - FSH |  پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش، تشخیص و تست و آنالیز | کیت الایزا FSH |
| Ver. No: 04 | | FSH ELISA KIT |

کنترل کیفی:

در هر کیت یک نمونه کنترل وجود دارد که مقادیر مورد انتظار برای هر یک بر روی 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 بر روی سرم تعدادی از مراجعه کنندگان (سنین 20-55 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 2/5 و 97/5٪ 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 | 2.5 th -97.5 th 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 |

| | | |
|-------------------|---|----------------|
| IVD-REF: PS - FSH |  پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص‌های و تست‌های نوآوری | کیت الایزا FSH |
| Ver. No: 04 | | FSH ELISA KIT |

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 بلاتک تحت عنوان مقدار صدک 95ام (95th percentile) از 60 بار اندازه گیری بر روی نمونه شاهد (استاندارد صفر) طی چندین ران بدست آمد. حد شاهد (LoB) معادل غلظتی در نظر گرفته شد که 95٪ از 60 نتیجه اندازه گیری های تکراری مقداری کمتر از آن بدست دهد، مقدار حد شاهد 0.013 mIU/mL بدست آمد. برای تعیین حد آشکارسازی 20 اندازه گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم (n=20×3=60) 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 بالا معادل 0.1 mIU/mL تعیین گردید.

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

2- دقت (Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت FSH شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس و 2 انباشته سرمی تهیه شده از نمونه های بیمار و یک نمونه کنترل تجاری در سه نقطه نقاط مختلف بازه اندازه گیریمطابق با راهنمای EP A3-05 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) بدست آمد.

طی 10 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 (2×3×3×10). 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 |

| | | |
|-------------------|---|---------------|
| IVD-REF: PS - FSH |  پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی | کیت الیزا FSH |
| Ver. No: 04 | | FSH ELISA KIT |

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 FSH پیشگامان سنجش ایساتیس با سایر هورمون های گلیکوپروتئینی LH، TSH 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 10 درصد تغییر نکنند، 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:

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

| درصد تداخل (%) | غلظت | نوع ماده |
|-------------------|---------------|----------|
| 0.05 | μIU/ml 500 | TSH |
| 0.16 | mIU/ml 500 | LH |
| 0.08 | IU/L 25000 | hCG |

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

| | | |
|-------------------|---|----------------|
| IVD-REF: PS - FSH |  پیشگامان سنجش پخشکننده در زمینه تشخیص‌های و تست‌های آزمایشگاهی | کیت الایزا FSH |
| Ver. No: 04 | | FSH ELISA KIT |

4- 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 و نتایج 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 ($\mu\text{IU/mL}$) | Rep 1 ($\mu\text{IU/mL}$) | Rep 2 ($\mu\text{IU/mL}$) | 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.

5- درستی (Trueness):

5-1- 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 10 درصد تغییر نکند افزوده شد. و سپس بررسی توانمندی سیستم اندازه گیری در تشخیص مقدار افزوده شده از طریق رابطه زیر محاسبه گردید

| | | |
|-------------------|--|---------------|
| IVD-REF: PS - FSH |  پیشگامان سنچش پیشگامان در سنجش هورمون‌ها و تست‌های تشخیصی | کیت الیزا FSH |
| Ver. No: 04 | | FSH ELISA KIT |

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

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

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

در ارزیابی پیش رو از بالاترین استاندارد کیت به عنوان منبع آنالیت استفاده شد و مقدار بازیابی در 6 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% |

2-5- ارزیابی مقایسه ای (Method comparison):

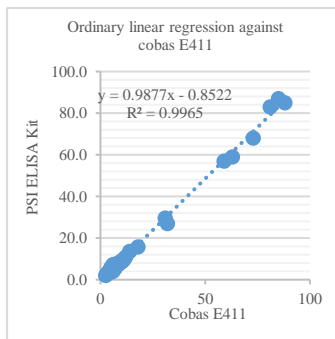
ارزیابی مقایسه ای بین نتایج اندازه گیری کیت سنچش FSH سرم شرکت پیشگامان و روش ECLIA- Cobas E411-Roche diagnostic (n=84 range:2.5-88 mIU/mL) انجام و مطابق با راهنمای EP 09-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) به روش رگرسیون خطی تحلیل گردید. در این ارزیابی نتایج کیت پیشگامان بر روی محور عمودی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

| | | |
|-------------------|--|---------------|
| IVD-REF: PS - FSH |  | کیت الیزا FSH |
| Ver. No: 04 | | FSH ELISA KIT |

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

$$r = 0.9982$$

$$r^2 = 0.9965$$



6- پدیده هوک:

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

| | | |
|-------------------|---|----------------|
| IVD-REF: PS - FSH |  پیشگامان سنجش پوهنتون کابل - کابل وزارت صحت، خدمات و تولیدات دارویی | کیت الایزا FSH |
| Ver. No: 04 | | FSH ELISA KIT |

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

| | | |
|-------------------|---|---------------|
| IVD-REF: PS - FSH |  پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش تشخیصی و تشخیصی | کیت الیزا FSH |
| Ver. No: 04 | | FSH ELISA KIT |

خطایابی در آزمایش های الیزا

| راه حل | علت مشکل | نوع مشکل |
|---|--|--------------------------------------|
| تکرار تست با کونزوگه جدید | افت و یا آلودگی کونزوگه | پایین بودن OD استانداردها و نمونه ها |
| 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. | پایین بودن دما و یا کوتاه بودن زمان انکوباسیون، به دما نرسیدن محلولهای کیت و نمونه بیماران | |
| 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. | PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها | |
| 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 جساب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید. | نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد | |
| 1. تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. 2. طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. | طول موج خوانش نامناسب (405nm بجای 450 nm) | |
| از سری استاندارد جدید استفاده کنید. | آلودگی استانداردها | |
| 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. | پیپتینگ نامناسب | صحیح نبودن نمودار استانداردها |

| | | |
|-------------------|---|----------------|
| IVD-REF: PS - FSH |  پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص‌های تشخیصی و تست‌های آنتی‌بادی | کیت الایزا FSH |
| Ver. No: 04 | | FSH ELISA KIT |

| | | |
|--|--|--|
| <p>1. PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید.</p> <p>2. پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید.</p> | <p>PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها</p> | |
| تکرار تست با استاندارد های جدید | آلودگی استاندارد صفر | |
| استفاده از محلول رنگزا جدید | آلودگی محلول رنگزا | |
| <p>1. عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید.</p> <p>2. تمام سوزن های دستگاه واش را چک کنید.</p> | <p>آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نامناسب</p> | <p>بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD</p> |
| <p>1. تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید.</p> <p>2. طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.</p> <p>3. از فیلتر 630 نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید.</p> | طول موج نامناسب در خوانش | |
| تکرار تست با محلول Stop جدید | آلودگی محلول Stop | |
| تکرار تست با مواد همان کیت | استفاده از مواد سایر کیت‌ها | |
| تکرار تست | انجام نشدن مرحله ای از تست | عدم تولید رنگ در چاهک‌ها |
| تکرار تست با محلول رنگزا جدید | آلودگی محلول رنگزا | |
| تکرار تست با محلول کونژوگه جدید | آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید | |
| <p>1. استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف</p> <p>2. از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید</p> <p>3. توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد.</p> | <p>پیپتینگ نامناسب، گرفتگی لوله داخلی سمپلر بواسطه آلودگی</p> | |

| | | |
|-------------------|--|---------------|
| IVD-REF: PS - FSH |  پیشگام سن‌جش پیشگام در سنجش‌های تشخیصی و تست‌وآزمی | کیت الیزا FSH |
| Ver. No: 04 | | FSH ELISA KIT |

| | | |
|--|--|-------------------------------------|
| <p>4. توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نشود.</p> <p>5. توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد.</p> <p>6. کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلر ها</p> | | <p>عدم تکرار پذیری مناسب</p> |
| فاصله زمانی بین اضافه کردن استاندارد ها و نمونه نباید بیشتر از 10 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. | کثیف بودن کف چاهکها | |
| قبل از استفاده، ویال محلول ها را به آرامی تکان دهید. | مخلوط نشدن محلول های کیت | |

| | | |
|-------------------|--|---------------|
| IVD-REF: PS - FSH |  <p data-bbox="448 142 638 182">پیشگامان سنجش روانشناسی و مشاوره تحصیلی و شغلی</p> | کیت الیزا FSH |
| Ver. No: 04 | | FSH ELISA KIT |