IVD-REF: PS - PRL	پیشگامان سنجش پیشگام در سنجش و نوآوری	کیت الایزا پرولاکتین
Ver. No: 04		Prolactin ELISA KIT

معرف	48 تستی	96 تستی	آماده سازی
پلیت پوشیده شده با آنتی بادی علیه پرولاکتین	1×48 wells	1×96 wells	آماده مصرف
کالیبراتور 1-6 (0، 5، 10، 25، 50، و 100نانوگرم در میلی لیتر) با قابلیت ردیابی به ماده مرجع WHO ISO 84/500 در بافر سازگار با سرم انسانی، همراه با نگهدارنده	6 ×0.5 mL	6 ×0.5 mL	آماده مصرف
یک 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
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 بنزدین 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 Prolactin ELISA Kit شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس برای اندازه گیری کمی آزمایشگاهی هورمون پرولاکتین (Prolactin) در سرم یا پلاسما طراحی گردیده است.

مقدمه :

هورمون پرولاکتین در هیپوفیز قدامی ساخته و به صورت دوره ای ترشح می شود. این هورمون متشکل از 198 اسیدآمینه با وزن مولکولی تقریبی 22 تا 23 کیلودالتون است. پرولاکتین در سرم به سه شکل یافت می شود. فرم فعال بیولوژیک تک واحدی یا مونومر (کوچک یا little)که فرم غالب پرولاکتین در سرم است و در حدود 80% پرولاکتین سرم را تشکیل می دهد. 20%- 5 پرولاکتین سرم به فرم غیرفعال بیولوژیک دو واحدی یا دیمر(فرم بزرگ یا big) و در حدود 5%-0/5 پرولاکتین موجود در سرم به شکل غیرفعال چهار واحدی تترامر (خیلی بزرگ یا Big-big) در سرم وجود دارد. اندام هدف پرولاکتین، غدد پستان است که باعث تحریک رشد و تمایز آن می شود. غلظت های بالای پرولاکتین اثر مهاری بر تولید استروئیدها در تخمدان و تولید و ترشح گنادوتروپین های هیپوفیزی دارد. طی حاملگی میزان پرولاکتین سرم به دلیل افزایش میزان استروژن و پروژسترون، افزایش چشمگیری می یابد.

یکی از شایعترین علل اصلی ناباروری در مردان و زنان افزایش میزان پرولاکتین است. عملکرد تحریکی پرولاکتین برروی غدد پستان منجر به شیردهی بعداز زایمان می گردد. سنجش میزان پرولاکتین در تشخیص نامنظمی های چرخه جنسی زنان، قطع قاعدگی ناشی از افزایش پرولاکتین، گالاکتوره یا شیر ریزش (جاری‌شدن بی‌اختیار شیر از پستان خارج از دوران بارداری و شیردهی)، بزرگی پستان، کم کاری اولیه تیروئید، تخمدان پلی سیستیک، بی اشتهایی و کمبود اسپرم در مردان کاربرد دارد. تومورهای پارانئوپلاستیک نظیر سرطان ریه نیز می توانند به عنوان مراکز نابجای تولید پرولاکتین عمل کرده و باعث افزایش پرولاکتین سرم گردند. معمولاً مقادیر بسیار بالای پرولاکتین بر وجود آدنومای هیپوفیز دلالت دارد. اندازه گیری پرولاکتین همچنین در مواقع شک به سرطان پستان و تومورهای هیپوفیزی کاربرد دارد.

در برخی موارد، مقادیر فرم های غیر فعال بزرگ و خیلی بزرگ پرولاکتین در سرم بالا رفته که این امر منجر به افزایش سطح اندازه گیری پرولاکتین در روشهای ایمونواسی می گردد. این حالت که از آن به عنوان ماکروپرولاکتینمی یاد می شود، به دلیل غیرفعال بودن فرمهای بزرگ با علائم بالینی قابل توجهی همراه نیست و باید از هایپرپرولاکتینمی واقعی تفکیک شود.

یادآوری: جهت دریافت روش ارزیابی ماکروپرولاکتینمی با بخش خدمات پس از فروش شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس تماس بگیرید.

اساس آزمایش :

مبنای کیت سنجش پرولاکتین شرکت تولیدی-تحقیقاتی پیشگامان سنجش ایساتیس بر پایه الایزا نوع ساندویچی می باشد. به طور خلاصه استاندارد یا کنترل یا نمونه بیمار همراه با آنتی بادی کونژوگه با آنزیم HRP علیه پرولاکتین به فاز جامد پوشیده از آنتی بادی ضد پرولاکتین، که نسبت به آنتی بادی کونژوگه شاخص های متفاوتی از پرولاکتین را شناسایی می کند، اضافه می شوند. پرولاکتین موجود در استاندارد/کنترل/ نمونه بیمار بین دو آنتی بادی به حالت ساندویچ در می آید. سپس اجزای اتصال نایافته طی شستشو از محیط خارج و با افزودن محلول سوبسترا - رنگزا و انکوباسیون بمدت 15 دقیقه رنگ آبی به وجود می آید. با افزودن محلول متوقف گر، واکنش آنزیمی متوقف می گردد و در نهایت شدت جذب نوری در 450 نانومتر اندازه گیری می شود. شدت رنگ تولید شده با مقدار پرولاکتین موجود در سرم نسبت مستقیم دارد.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

1. سمپلرهای20، 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.
2. آب مقطر با هدایت کمتر از 1 µS/cm
3. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر 450 نانومتری و در صورت امکان 630 نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.
4. کاغذ جاذب رطوبت
5. 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 ترجیحا 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 طبی آزمایشگاهی کاربرد دارد.

2. کلیه معرف های کیت برای سنجش مستقیم پرولاکتین در سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده اند و برای سنجش پرولاکتین در 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 به خوبی فراگرفته 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 وتکنیک 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 اجزاء 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 منشا 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 رهایی 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(20-27°C) 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 پرولاکتین نمونه بیش از 100 ng/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 الایزا20 تا27 درجه سانتیگراد می باشد.
6. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی 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. اگر کل پلیت هم زمان ران می شود، برای پرهیز از خطای ناشی از اختلاف زمانی انکوباسیون بین چاهک ها(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- 20 میکرولیتر از استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار به داخل هر چاهک بریزید.

3- 100 میکرولیتر از محلول کونژوگه ، به تمام چاهک ها اضافه کنید.

4- پلیت را بمدت 30 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 45 دقیقه در دمای اتاق(20-27°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 رطوبت 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.

6- 100 میکرولیتر از سوبسترا-رنگ زا آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را بمدت 15 دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

7- 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 630نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس 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 تمامی نقاط تلاقی عبور کرده باشد،ترسیم کنید.

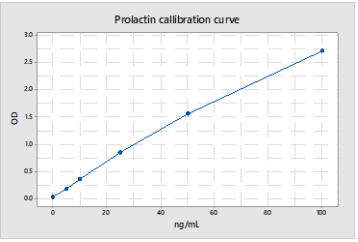
2. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

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 دستوالعمل دستگاه مراجعه نمایید. برای محاسبه نتایج کیت پرولاکتین 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	ng/mL	OD
1	0	0.029
2	5	0.177
3	10	0.350
4	25	0.840
5	50	1.550
6	100	2.700



یادآوری : با ضرب مقادیر پرولاکتین برحسب ng/mL در ضریب 21/3 مقادیر پرولاکتین برحسب mIU/mL بدست می آید و بالعکس با ضرب مقادیر پرولاکتین برحسب mIU/mL در عدد 0.047 مقادیر پرولاکتین برحسب ng/mL بدست می آید.

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 چندین آزمایشگاه مختلف در سطح استان تهران به عمل آمد ، دامنه مرجع برای گروه های مختلف سنی و جنسی براساس درون یابی دامنه بین 2/5% و 97/5% مرکزی با استفاده از کیت الایزا پرولاکتین شرکت پیشگامان بازه زیر برای بالغین بدست آمد. لازم به ذکر است به دلیل تفاوت های بیولوژیک بین جمعیت های مختلف، و همچنین عواملی نظیر سن، جنس، نژاد، 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.

گروه	تعداد(n)	2.5^{th}- 97.5 percentile
مردان	100	1.8-21.4 ng/ml
زنان قبل از یائسگی	180	4.6-29.5 ng/ml
زنان بعد از یائسگی	130	1.5-18.5 ng/ml

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 (95^{th} 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 با این روش معادل 0.015 ng/mLبدست آمد. برای تعیین حد آشکار سازی 20 اندازه گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم(n=20×3=60)

با محتوای پرولاکتین کمتر از1ng/mL که مقدار پرولاکتین 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 آشکار سازی قرار گرفت. و از رابطه زیر حد آشکارسازی معادل***1.0 ng/mL*** تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645SD_L$$

2- دقت(Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت پرولاکتین شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس و 2 انباشته سرمی Pooled serum تهیه شده از نمونه های بیمار و یک نمونه کنترل تجاری در نقاط مختلف بازه اندازه گیری (1- 100 ng/mL) 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 به کمک یک نرم افزار صفحه گسترده و با روش آماری Fully nested ANOVA تحلیل گردید: خلاصه نتایج در جدول زیر آورده شده است:

Sample Description	Mean (ng/mL)	Repeatability		Within-Laboratory Precision	
		SD	%CV	SD	%CV
Patient Pool	8.521	0.69	8.14	0.77	8.98
Patient Pool	24.645	1.25	5.05	1.54	6.25
L3-Biorad	59.641	3.21	5.39	4.25	7.12

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 پرولاکتین پیشگامان سنجش ایساتیس با سایر هورمون های گلیکوپروتئینی انسانی 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 پرولاکتین همزمان در یک ران در نمونه هایی که با ماتریکس بی اثرspike 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 پرولاکتین اولیه بیان گردید. نتایج در جدولی که در ادامه می آید خلاصه شده است:

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

نوع ماده	غلظت	درصد تداخل(٪)
hTSH	500 µIU/ml	0.13
hLH	500 mIU/ml	0.17
hFSH	500 mIU/ml	0.04

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

4- خطی بودن(Linearity):

به منظور ارزیابی خطی بودن یک نمونه با غلظت اولیه 93 ng/mL را با نمونه دیگری با غلظت 2.5 ng/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 به روشی که در بخش ارزیابی درستی شرح داده می شود، در نقاط مختلف محاسبه کردیم، که نتایج در جدول زیر خلاصه شده است.

No	Ratio	Expected (ng/mL)	Rep 1 (ng/mL)	Rep 2 (ng/mL)	recovery%	%Bias
1	1	93	93	93	-	-
2	0.9	83.95	84	82.5	99.17%	-0.83%
3	0.8	74.9	73.1	72.5	97.20%	-2.80%
4	0.7	65.85	64.3	61.3	95.37%	-4.63%
5	0.6	56.8	52.4	53.4	93.13%	-6.87%
6	0.5	47.75	45.5	46.2	96.02%	-3.98%
7	0.4	38.7	37.5	36.4	95.48%	-4.52%
8	0.2	20.6	19.7	21.4	99.76%	-0.24%
9	0.1	11.55	10.7	1.0.5	92.64%	-7.36%
10	0	2.5	2.5	2.5	-	-

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 پرولاکتین انجام گرفت. به طور خلاصه نمونه اولیه به دو بخش مساوی تقسیم و به یکی حجمی از سرم حاوی مقدار مشخص پرولاکتین 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:

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

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	10 ng/mL added		20 ng/mL added		40 ng/mL added	
		Recovery%	Bias%	Recovery%	Bias%	Recovery %	Bias%
1	9.25 ng/mL	112	6.23%	109	6.15%	108	7.95%
2	24.56 ng/mL	110	2.89%	95	-2.24%	107	5.88%
3	57.24 ng/mL	98	-0.30%	112	3.11%	93	-4.15%

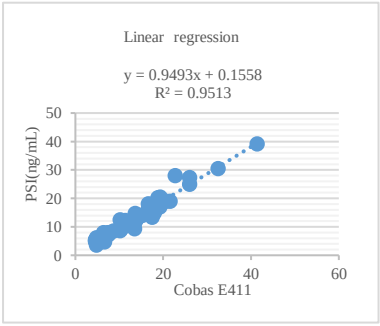
2-5- ارزیابی مقایسه ای(Method comparison)

ارزیابی مقایسه ای بین نتایج اندازه گیری کیت سنجش پرولاکتین سرم شرکت پیشگامان و روش ECLIA-Cobas E411-Roche diagnostic (n=56) انجام 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 yها) و نتایج روشECLIA برروی محور افقی(محور xها) مشخص و نمودار رگرسیون خطی ترسیم گردید. خلاصه نتایج و نمودار رگرسیون خطی(Linear regression) در ادامه آورده شده است:

$$PSI = 0.9493ECLIA - 0.1558$$

$$r = 0.9753$$

$$r^2 = 0.9513$$



6- پدیده هوک

در این کیت ، اثر هوک تا غلظت 4000 ng/ml دیده نشد.

منابع و مراجع

1. Barth J.H et al.(2018). Observational studies on macroprolactin in a routine clinical laboratory. Clin Chem lab Med.26(56) 1-4.

2. 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.

3. CLSI. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline. CLSI document EP 05-A3. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2014.

4. CLSI. Interference Testing in clinical chemistry; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP07-A23. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2005.

5. Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation, https://www.westgard.com/biodatabase1.htm

6. McPherson R.A. et al.(2017).HENRY'S Clinical diagnosis and management by Laboratory Methods. 23rd ed. (pp. 363-364). Elsevier Inc.

7. Pagana K.D. et al. (2018). Mosby's Manual of diagnostic and Laboratory tests.6th ed. Elsevier Inc.

8. Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics.6th ed. Elsevier Inc.

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.
	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید.

صحیح نبودن نمودار استانداردها	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 بالایWash 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.