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

معرف	۴۸ تستی	۹۶ تستی	آماده سازی
پلیت پوشیده شده با آنتی بادی علیه پرولاکتین	1×48 wells	1×96 wells	آماده مصرف
کالیبراتور ۱-۶ (۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، و ۱۰۰ نانوگرم 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 ۱ به ۲۰ با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید
محلول سوبسترا-رنگ زا(تترامتیل بنزدین و آب اکسیژنه)	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول توقف (اسید کلریدریک ۱ 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 ۱۹۸ اسیدآمینه با وزن مولکولی تقریبی ۲۲ تا ۲۳ 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 ۸۰% پرولاکتین سرم را تشکیل می دهد. ۲۰%- ۵ پرولاکتین سرم به فرم غیرفعال بیولوژیک دو واحدی یا دیمر(فرم بزرگ یا big) و در حدود ۵%-۰/۵ 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 ۱۵ دقیقه رنگ آبی به وجود می آید. با افزودن محلول متوقف گر، واکنش آنزیمی متوقف می گردد و در نهایت شدت جذب نوری در ۴۵۰ 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 :

۱. سمپلرهای۲۰، 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 کمتر از $1\ \mu S/cm$

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 شستشو باشد.

نگهداری کیت :

۱. کیت پس از تحویل باید در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد (یخچال) نگهداری شود. کلیه معرف ها و اجزاء کیت تا تاریخ انقضاء مندرج 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 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.

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 ترجیحا استفاده نشود.

۳. در صورتی که انجام آزمایش در همان روز جمع آوری نمونه امکان پذیر نباشد، نمونه ها را می توان برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگه داری کرد. برای مدت طولانی تر نمونه ها باید در$-20^{\circ}C$ سانتیگراد نگهداری شود.

۴. از ذوب و انجماد مکرر نمونه ها اجتناب شود. نمونه های منجمد باید قبل از آزمایش به آرامی، اما به طور کامل مخلوط شده تا کاملاً یکنواخت و همگن گردد.

احتیاطات و هشدارها

۱. کیت فقط برای تشخیص طبی آزمایشگاهی کاربرد دارد.

۲. کلیه معرف های کیت برای سنجش مستقیم پرولاکتین در سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده اند و برای سنجش پرولاکتین در 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 به خوبی 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 کلریدریک است با پوست جلوگیری شود. در صورت تماس با آب و صابون شستشو داده شود.

۶. 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.

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 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 ۱۳۹۴ مراجعه نمایید.

آماده سازی معرف ها:

۱. همه معرف ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق(۲۰-۲۷°C) 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 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.

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. 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.

۱۱. در هر بار انجام آزمایش منحنی کالیبراسیون را مجدد ترسیم نموده و برای محاسبه نتایج از منحنی ذخیره شده استفاده نکنید.

۱۲. مراحل آزمایش را بدون وقفه انجام دهید. وقفه بین مراحل باعث نتایج کاذب می گردد.

۱۳. در کلیه مراحل انجام آزمایش و متعاقب هر مرحله پیپتینگ، چاهک ها از نظر وجود حباب بررسی شوند. 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 چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده نمگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.

۲- ۲۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار به داخل هر چاهک بریزید.

۳- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه ، به تمام چاهک ها اضافه کنید.

۴- پلیت را بمدت ۳۰ 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($۲۰-۲۷^{o}C$) 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 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.

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.

۷- 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 ۱۰ دقیقه جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول موج ۶۳۰نانومتر 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.

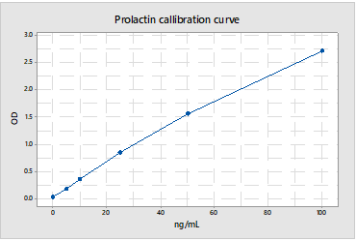
۲. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

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 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 ۲۱/۳ 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 ۲/۵% و ۹۷/۵% 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	۱۰۰	1.8-21.4 ng/ml
زنان قبل از یائسگی	۱۸۰	4.6-29.5 ng/ml
زنان بعد از یائسگی	۱۳۰	1.5-18.5 ng/ml

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 (95^{th} percentile) از ۶۰ بار اندازه گیری برروی نمونه شاهد(استاندارد صفر) طی چندین ران بدست آمد. حد بلانک معادل غلظتی درنظر گرفته شد که ۹۵٪ از ۶۰ 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 ۲۰ اندازه گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم(n=۲۰×۳=۶۰)

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.

$$LOD = LOB + 1.645SD_L$$

۲- دقت(Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت پرولاکتین شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس و ۲ 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 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(۲×۳×۳×۱۰). 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

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 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 ۱۰ 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.

۴- خطی بودن(Linearity):

به منظور ارزیابی خطی بودن یک نمونه با غلظت اولیه ۹۳ ng/mL را با نمونه دیگری با غلظت ۲/۵ 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	-	-

۵- درستی(Trueness):

۵-۱- 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 ۱۰ 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%

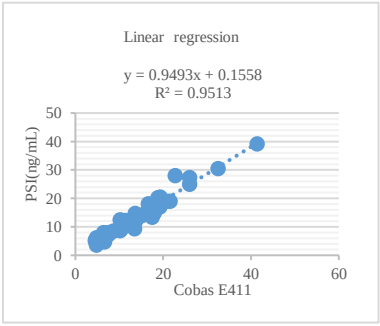
۲-۵- ارزیابی مقایسه ای(Method comparison)

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:

$$PSI = 0.9493ECLIA - 0.1558$$

$$r = 0.9753$$

$$r^2 = 0.9513$$



٦- پدیده هوک

در این کیت ، اثر هوک تا غلظت ۴۰۰۰ 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	۱.دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید. ۲.قبل از شروع آزمایش کیت و نمونه بیماران به دمای اتاق برسد.
	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	۱.PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲.پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	۱.پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. ۲.پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.
	طول موج خوانش نامناسب (۴۵۰ nm بجای ۴۰۵ nm)	۱.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. ۲.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
صحیح نبودن نمودار استانداردها	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید.
	پیپتینگ نامناسب	۱.استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف ۲.از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید. ۳.توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد.

		۴.توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود.
	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	۱ . PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲.پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
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	۱.عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲ . تمام سوزن های دستگاه واشر را چک کنید.
	طول موج نامناسب در خوانش	۱.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. ۲.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. ۳.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	۱. استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف ۲. از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید ۳. توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. ۴. توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نشود. ۵. توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد. ۶. کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلر ها
	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.
عدم تکرار پذیری مناسب	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.

Prolactin ELISA KIT	PISHGAMAN SANJESH ISATIS	IVD-REF: PS - PRL
		Ver. No: 02

INTENDED USE

For the quantitative determination of Prolactin concentration in human serum or plasma.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Prolactin is synthesized in anterior hypophysis and secreted in a circadian fashion. This hormone is made up of 198 amino acids with approximate molecular weight of 22-23 KDa. It is found in human serum in three different forms. Biologically active nonglycosylated monomeric form(Little) which is the predominant form of human serum prolactin and in a healthy woman consist of 80% of serum prolactin, followed by biologically inactive dimeric form (big form) and tetrameric(Big-big) form which has low biologic activity. Mammary gland is target organ for prolactin and its differentiation and development induced by this hormone. High prolactin concentration has inhibitory effect on steroids production in ovaries and hypophyseal gonadotropin secretion. During pregnancy, serum prolactin level increases considerably due to elevation of estrogens and progesterone concentrations.

Hyperprolactinemia (in men and women) is the main cause of fertility disorders. Stimulatory effect of prolactin on mammary gland leads to post-partum lactation. Prolactin measurement is helpful in diagnosis of oligomenorrhea (infrequent menstrual periods), amenorrhea, galctorrhea, loss of libido, impotence, primary hypothyroidism, polycystic ovary syndrome and azoospermia and hypogonadism in men. Extremely high levels of prolactin most often indicate pituitary adenoma, while other para-neoplastic tumors such as lung cancer can also act as an ectopic centre for prolactin secretion and may lead to hyperprolactinemia.

Because forms other than monomeric prolactin all react with immunoassays, they can result in falsely high PRL results in patients in whom a pathological elevation of PRL is not supported by CT or MRI and clinical findings. Various methods have been developed to eliminate this confusion, including measurement following polyethylene glycol extraction and centrifugal ultrafiltration.

PRINICPLES OF THE METHOD

The PSI Prolactin ELISA lit is a solid-phase, non-competitive immunoassay based upon the direct sandwich technique. Calibrators, controls and patient samples are incubated in anti-prolactin coated microplate together with a HRP-conjugated anti- Prolactin monoclonal antibody which recognize Prolactin from different sites. Prolactin present in calibrators/controls or samples is reacted with both capture and detection antibodies to form a sandwich complex. The strips are then washed and, buffered substrate/chromogen reagent (hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine) is added to each well and the enzyme reaction is allowed to proceed. During the enzyme reaction a blue color will develop and the intensity of the color is directly proportional to the amount of Prolactin present in the samples.

REAGENTS PROVIDED

Reagent	Quantity/48 Test KIT	Quantity/96 Test KIT	Quantity/192 Test KIT	Reconstitution
Microplate (96 breakable wells) coated with Anti-prolactin Mab	48 wells	96 wells	192 wells	Ready to Use
Calibrators 1-6 (0, 5,10, 25, 50 and 100, ng/mL) in buffer, containing preservative with traceability to reference material "WHO ISO 84/500"	6 Vial/0.5 ml	6Vial/0.5 ml	6 Vial/1.0 ml	Ready to Use
Control serum in buffer compatible with human serum matrix with preservatives	1 Vial/0.5 ml	1 Vial/0.5 ml	1 Vial/1.0 ml	Ready to Use
Enzyme Conjugate (red color)	1 Vial/6.0 ml	1 Vial/12.0 ml	2Vial/12 ml	Ready to use
Concentrated Wash solution	1 Vial/30ml	1 Vial/30 ml	1 Vial/50 ml	Dilute 20X with distilled water
Substrate-Chromogenic solution (Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide)	1 Vial/6.0ml	1 Vial/12ml	2 Vial/12 ml	Ready to Use
Stop solution (H2So4 0.12M) Additional information about other additive is considered proprietary.	1 Vial/6.0 ml	1 Vial/6.0 ml	1 Vial/12.0 ml	Ready to Use

Materials required but not supplied with kit

The following materials are required but not provided in the kit:

- Distilled water with conductivity < 1µS/cm^3
- Precision micropipettes for delivery of 20, 50, 100 microliters. An 8-channel pipette or respenser pipette with disposable plastic tips for delivery of 50-100 µL is useful but not essential.
- Pipettes for dispensing milliliter volumes.
- Vortex mixer
- Automatic washer or any other device which can deliver 350 microliter wash solution for microplates
- Microplate reader with a filter set at 450 nm and an upper OD limit of 3.0 or greater* (see measurement procedure step 9).

STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- If kept at 2-8 °C, before opening or reconstitution, all kit components are stable until the expiry date as indicated on the label on the outside of the kit box.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the preparation day.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration of regents.
- The substrate solution (TMB) is sensitive to light and should remain colorless if properly stored. Instability or contamination may be indicated by the development of a blue color, in which case it should not be used.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Human serum and EDTA plasma are samples of choice for PSI PRL kit.
- If the measurement cannot be done within 24 hours after sample collection, samples should be kept at 2-8 °C up to 48 hours. For longer storage, serum or plasma must be stored at -20°C.

Avoid repeated freeze and thaw cycles. Frozen specimens must be gently but thoroughly mixed after thawing

PRECAUTIONS AND WARNINGS

- For Professional in vitro diagnostic Use Only
- All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of Prolactin in human serum. The kit is not calibrated for the determination of prolactin in urine, Non-EDTA plasma or other specimens of human or animal origin.
- Before starting the assay, read this instruction completely and carefully. Use the valid version of the instruction provided with the kit. Be sure that everything is understood
- Please refer to the U.S. Department of Health and Human Services (Bethesda, Md., USA) publication No (CDC) 88—8_95 on laboratory safety procedures or any other local or national regulation.
- Handle all patient specimens as potentially infectious.
- Reagents contain sodium azide (NaN3) as a preservative. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. Follow local guidelines for disposal of all waste material.
- Avoid any skin contact with all reagents; stop solution contains strong acid. In case of contact, wash thoroughly with soap and water.

Caution

- Material used in the preparation of human source reagent has been tested and found to be non-reactive for HIV 1 & 2 antibodies, HCV antibody and hepatitis B Surface Antigen (HBsAg). Since no method can completely rule out the presence of blood borne diseases, the handling and disposal of human source reagents from this product should be made as if they were potentially infectious.

Preparation of reagents

Wash Buffer:

According to volume required, pour the desired volume of wash concentrate into a clean container and dilute 20 fold by adding adequate volume of distilled or deionized water to give a buffered Wash Solution. E.g. 10 mL wash concentrate to 190 mL distilled water. Wash solution should be prepared daily and discard unused working wash solution at the end of the day.

HANDELING NOTES:

- Do not use the kit or components beyond expiry date.
- Do not mix up vials caps.
- Do not mix reagents from different kit lots.
- All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use.
- A calibrator curve must be established for every run.
- Calibrators, controls and specimen samples should be assayed in duplicate. Vertical alignment is recommended.
- Use a clean container and high quality distilled or deionized water to prepare the Working Wash solution.
- In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
- For the dispensing of Chromogenic and Stop solution, avoid pipettes with metal parts.

- High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
- Adhere the incubation times carefully. Tolerance limit of incubation time is ±5%
- Tto avoid drift, arising from low volume sample evaporation or incubation time difference between first and last well, it is strongly recommended not to run more than six strips when pipetting manually (Time delay).
- Perform all steps consecutively without any delay. Any delay in each step has deleterious effects on measurement results.
- Draw a calibration curve for each run, do not use stored curve from previous runs.
- Incubation with Chromogenic solution must be done in dark.
- Opened reagents are stable maximally for 8 weeks if they are not contaminated, and stored in resealed original containers and handled as prescribed. Return to 2-8°C immediately after use
- Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations

Measurement Procedure

1. Remove the required number of well strips. Reseal the bag and return any unused strips to the refrigerator.
2. Pipette 20 µL of each Calibrator (calibrators 0, 10, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/mL), controls and patient samples in duplicate into the appropriate wells.
3. Pipette 100 µL of enzyme conjugate into each well. Avoid carry-over by holding the pipette tip slightly above the top of the well and avoid touching the plastic strip or surface of the liquid.
4. Gently mix for 30 seconds
5. Cover the plate with an adhesive seal and incubate for 45 minutes at room temperature(20-27°C).
6. Wash the plate according to procedure below.
    a. Carefully dispense 350 µL of working wash solution into each well.
    b. Aspirate the content of each well.
    c. Repeat 4 additional wash for a total of 5 wash cycles.
    d. After the end of last wash cycle invert the plate and tap it carefully against an absorbent paper.

Note: Automatic strip washer: Follow the manufacturer's instructions for maintenance and wash the required number of wash cycles.

7. Add 100 µL of Chromogenic solution TMB to each well using the same pipetting technique as in procedural note 3. The Chromogenic solution TMB should be added to the wells as quickly as possible.
8. Incubate for 15 min at room temperature preferentially in the dark.
9. Add 50 µL of Stop Solution, mix and read the absorbance at 450 nm (with a reference filter 620, 630, or 650) in a microplate spectrophotometer within 10 min after addition of Stop Solution.

Important Note: *always add stop solution in the same order as chromogenic solution TMB.*

CALCULATION OF RESULTS

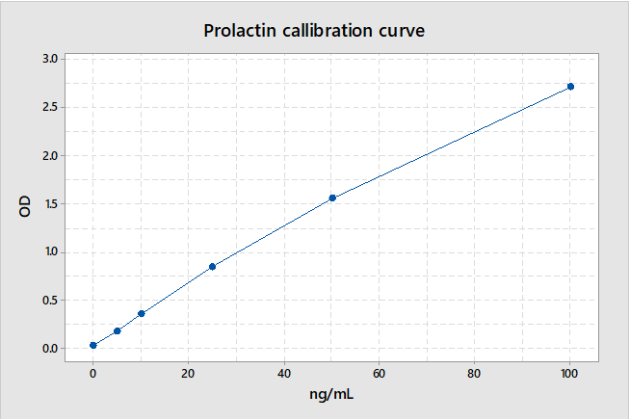
1. Construct a calibration curve by plotting the average O.D. (450 nm) for each calibrator on the vertical (Y) axis against the concentration on the horizontal (X) axis, and draw a best fit curve through the points on the graph.
2. To determine concentration of Prolactin in each sample, first locate the O.D. value on the Y-axis and extend a horizontal line to the calibration curve. At the point of intersection, draw a vertical line to the X-axis and read the corresponding concentration.
3. If a microplate spectrophotometer with built-in data calculation program is used, refer to the manual

for the spectrophotometer and create a program using the concentration stated on the label of each of the Prolactin calibrators. For automatic calculation of Prolactin results it is recommended to use point-to-point method.

Typical Data

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real-time calibration curve.

OD	ng/mL
0.029	0
0.177	5
0.350	10
0.840	25
1.550	50
2.700	100



Quality control

Prolactin control serum should be used for validation of the assay series. Ranges of expected results are indicated on the vial label. If assigned range are not obtained, a complete check of reagents and reader performance should be made and the assay shall be repeated. Each laboratory can also prepare its on serum pools at different levels, which can be used as internal controls in order to ensure the precision of the assay.

Reference interval

A study with PSI Prolactin EIA kit was performed using samples from some apparently healthy persons (ages 20-55),following reference interval corresponding to 2.5th and 97.5th percentiles of results was extrapolated. Each laboratory should first investigate the transferability of the recommended expected value to its own patient population and if it doesn't match, determine its own reference interval.:

Age sex group	N	Reference interval
Men	100	1.8-21.4 ng/ml
Women-pre-menopausal	180	4.6-29.5 ng/ml
Women-post-menopausal	130	1.5-18.5 ng/ml

PERFORMANCE CRITERIA

1. Lower limit of measurement:

The Limit of Blank and Limit of Detection were determined according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A2 guideline.

In brief Limit of Blank was determined as the 95th percentile value from n = 60 measurements on standard 0 over several runs. The Limit of blank equals to the concentration that 95% of repeated measurements on zero

standard give value below it. In the next step we determined standard deviation of repeated measurements on 3 samples with Prolactin contents less than 1.5 ng/mL determined from a separate method study (ECLIA Method). By adding the LOB calculated at 1st step to 1.645 times the greatest standards deviation calculated in the 2nd step($LOD = LOB + 1.645SD_L$) LOD calculated as 1.0 ng/mL.

2. Precision:

Precision was determined using PSI Prolactin Kit reagents and two pooled human sera and a commercial control material according to EP05-A3 Guideline.

Three runs per day (morning, midday and afternoon) by 3 user in 10 working days($10 \times 3 \times 3$). Results analyzed by fully nested ANOVA. Following results were obtained:

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. Specificity:

Specificity evaluation was performed according to guideline CLSI EP07-A2 to assess the cross-reactivity of the assay with following cross-reactants. Samples containing cross-reactants was prepared by spiking natural human sera with material containing high levels of cross-reactants. Modification of serum matrix was no more than 10%. The % cross-reactivity was calculated for each sample using the equation below and normalized to the Prolactin content:

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

The results are summarized in the following table:

Cross-reactants	Concentration	% cross reactivity
hTSH	500 µIU/ml	**0.13**
hLH	500 mIU/ml	**0.17**
hFSH	500 mIU/ml	**0.04**

Interference evaluation from common sample abnormalities, hemolysis, Lipemia and icterus were also performed according to aforementioned document and percentage interference calculated using following formula:

$$\%interference = \frac{measured\ value - true\ value}{true\ value} \times 100\%$$

No interference were seen up to following listed concentration:

Interferent	source	Final concentration of interferent in test serum
Hemoglobin	Fresh haemolysed blood	**50 mg/mL**
Conjugated Bilirubin	Commercially crystalline Unconjugated Bilirubin	**20 mg/dL**

Triglycerides	Commercially Intralipid 10%	**1000 mg/dL**

4. Linearity

Evaluation of Linearity was performed according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP 06-A guideline

In brief a sample with concentration of 93 ng/mL Prolactin as a high sample was diluted with another sample with 2.5 ng/mL in different proportions and their Prolactin, measured in duplicate on each dilution.

Measured values compared with expected values which estimated by dilution formula, then % bias and %recovery calculated for each concentration and following results are obtained:

No	Ratio	Expected (ng/mL)	Rep 1 (ng/mL)	Rep 2 (ng/mL)	recovery%	%Bias
1	**1**	93	92	94	NA	NA
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	2.1	2.9	NA	NA

NA: Not applicable

5. Trueness:

6. 5.1. Recovery Evaluation (Proportional error)

Recovery was assessed by adding three different amount of prolactin to three sample with different prolactin contents. Then % recovery and % bias was calculated for each sample using the equations below:

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

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

The results are summarized in the following table:

Sample	Original concentration	10 ng/mLadded		20 ng/mLadded		40 ng/mLadded	
		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%

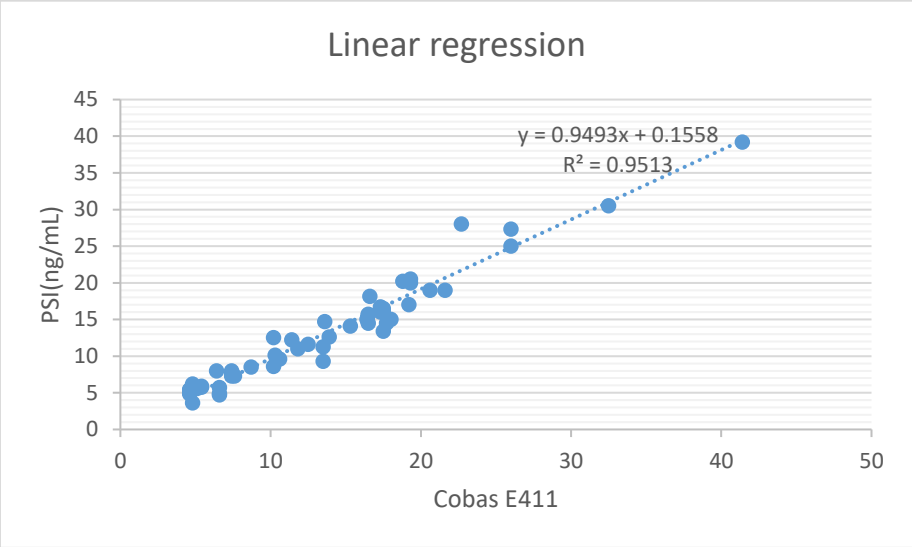
5.2. Method comparison:

A comparison of the PSI Prolactin ELISA kit (y axis) using patient samples (**n=56**) with **ECLIA-Cobas E411-Roche diagnostic** (X axis) gave the following results by ordinary linear regression:

$$PSI = 0.9493ECLIA - 0.1558$$

$$r = 0.9753$$

$$r^2 = 0.9513$$



7. High dose hook effect

In PSI Prolactin EIA kit high dose hook effect has not been seen up to 4000 ng/mL

References:

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. Kasper D.L. et al. (2015). Harrison's principles of internal medicine.19th ed. Mc Graw Hill Education
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.
9. Royal college of pathologists of Australasia. https://www.datainnovations.com/allowable-total-error-table

Prolactin ELISA KIT	PISHGAMAN SABJESH ISATIS	IVD-REF: PS - PRL
		Ver. No: 02

Procedure in-brief