معرف	۴۸ تستی	۹۶ تستی	آماده سازی
پلیت پوشیده شده با استرپتاویدین	1×48 wells	1×96 wells	آماده مصرف
کالیبراتور ۱-۶ (۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ mIU/mL) با قابلیت ردیابی به ماده مرجع WHO 2nd ISO 80/552در بافر سازگار با سرم انسانی، همراه با نگهدارنده	6 ×0.5 mL	6 ×0.5mL	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 LH ELISA Kit شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس برای اندازه گیری کمی آزمایشگاهی هورمون لوتئال (LH) در سرم یا پلاسما طراحی گردیده است.

مقدمه :

هورمون لوتئال یا LH به همراه هورمون محرکه فولیکولی (FSH) توسط سلول های گونادوتروپین هیپوفیز قدامی ترشح و به صورت هم افزایی وظیفه تنظیم و تحریک عملکرد غدد جنسی (تخمدان ها و بیضه ها) را برعهده دارند. این هورمون نیز همانند هورمونهای FSH، hCG و TSH دارای ساختار گلیکوپروتئینی با دو زنجیره است که شامل زنجیره α با ۹۲ اسید آمینه و زنجیره β با ۱۲۱ اسید آمینه می باشد. این دو زنجیره به صورت غیرکووالان به یکدیگر متصل هستند.

در زنان گونادوتروپین ها در مدار هیپوتالاموس، هیپوفیز گوناد‌ها , وظیفه کنترل چرخه قاعدگی را بر عهده دارد. LH و FSH به صورت موجی از سلول های گونادوتروپ هیپوفیز ترشح و وارد خون می شوند. در خون گونادوتروپین ها رشد و بلوغ فولیکول و ساخت استروژن ها و پروژسترون ها را تحریک می کند. حداکثر مقدار LH در میانه چرخه قاعدگی مشاهده می شود. در این زمان هورمون LH باعث القاء آزادسازی تخمک و تشکیل جسم زرد می گردد، که عمده ترین هورمون مترشحه آن پروژسترون است. درمردان LH تولید تستوسترون را از سلول های لایدیگ تحریک می کند.

از آنجایی که این دو هورمون به صورت موجی ترشح می شوند، ممکن است یک بار اندازه گیری به نتایج کاذب بیانجامد، یک راه حل برای غلبه بر این مشکل تهیه دو تا سه نمونه از بیمار با فاصله ۲۰ تا ۳۰ دقیقه و سپس انباشتن سرم ها به نسبت مساوی و اندازه گیری هورمون در نمونه انباشته(pooled) می باشد.

تعیین مقدار LH در یافتن علت سوء عملکرد مسیر هیپوتالاموس-هیپوفیز- غددجنسی به پزشک کمک می کند. از اندازه گیری LH و FSH در مواردی نظیر بیماری های مادرزادی همراه با ناهنجاری های کروموزومی(به عنوان مثال نشانگان تِرنر)، تخمدان پلی سیستیک(PCO)، کشف علل قطع قاعدگی، نشانگان یائسگی و بررسی نارسایی سلول های لایدیگ، استفاده می شود. اندازه گیری LH و FSH در تمایز نارسایی اولیه غدد جنسی از نارسایی ثانویه بسیار مفید است. در نارسایی اولیه نظیر آنچه که در PCO یا یائسگی دیده می شود، میزان این دو هورمون افزایش چشمگیری می یابد، در حالی که در نارسایی ثانویه ناشی ازنقصان عملکرد هیپوفیز میزان این دو هورمون کاهش می یابد. همچنین افزایش ناگهانی در میزان LH نشانه قریب الوقوع بودن آزادشدن تخمک از فولیکول هاست، که می تواند احتمال زیاد بارداری را نشان دهد.

اساس آزمایش :

مبنای کیت سنجش LH 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 همراه با کونژوگه که حاوی دو نوع آنتی بادی علیه LH یکی کونژوگه با بیوتین و دیگری کونژوگه با آنزیم HRP است و LH را از دو جایگاه متفاوت شناسایی می کنند به چاهک های پوشیده شده از استرپتاویدین اضافه می شوند. LH موجود در استاندارد یا کنترل یا نمونه بیمار بین دو آنتی بادی به حالت ساندویچ در آمده و مجموعه از طریق بیوتین به استرپتاویدین فازجامد متصل می شود. سپس اجزای اتصال نایافته طی شستشو از محیط خارج و با افزودن محلول سوبسترا - رنگزا و انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه رنگ آبی بوجود می آید. با افزودن محلول متوقف گر، واکنش آنزیمی متوقف می گردد. شدت جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری می شود.. شدت رنگ با مقدار LH 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 الکتریکی کمتر از 1 µS/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 نمگیر نگهداری شود. در هنگام استفاده پس از رسیدن دمای کیسه میکروپلیت به دمای اتاق، تعداد لازم استریپ را از کیسه آلومینیومی خارج و مابقی همراه نم گیر بلافاصله به کیسه منتقل و درب کیسه با دقت بسته و به یخچال منتقل گردد.

۵. محلول شستشو باید روزانه و تازه تهیه شود و در همان روز تهیه مصرف شود.

۶. تغییر در خصوصیات فیزیکی معرف ها نظیر وجود ذرات معلق در آنها اغلب حاکی از آلودگی و خرابی معرف ها می باشد.

۷. محلول سوبسترا-رنگ زا باید بی رنگ باشد. وجود رنگ آبی در این محلول نشان از خرابی و آلودگی آن دارد و باید دور ریخته شود.

۸. کیت های باز شده اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شوند، حداکثر به مدت ۸ هفته پایدار خواهند بود.

۹. اجزاء کیت ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابه جایی درب معرف ها جلوگیری شود.

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

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

۱. سرم یا پلاسمای EDTA نمونه مناسب برای این آزمایش است.

۲. از نمونه های با کدورت بالا، همولیز یا لیپمیک 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$-۲۰^{o}C$ 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 LH در سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده اند و برای سنجش LH در ادرار یا سایر مایعات بیولوژیک یا پلاسمای غیر EDTA مناسب نمی باشد.

۳. قبل از آغاز سنجش، دستورالعمل پیش رو را به دقت مطالعه نموده و اطمینان حاصل کنید که تمامی نکات آن را بخوبی فراگرفته اید. همواره از ویرایش معتبر و به روز دستورالعمل که همراه کیت بسته بندی شده است، استفاده کنید.

۴. کلیه جوانب ایمنی دراجرای آزمایش رعایت شود. برای آگاهی از احتیاطات لازم به "راهنمای اصول کلی حفاظت و پیشگیری از آلودگی کارکنان و محیط آزمایشگاه (روش های صحیح میکروب شناسی وتکنیک های صحیح آزمایشگاهی)" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش ۱۳۹۳ مراجعه نمایید.

۵. از تماس تمام معرف ها به ویژه محلول توقف که حاوی اسید کلریدریک است با پوست جلوگیری شود. در صورت تماس با آب و صابون شستشو داده شود.

۶. در این کیت برای ساخت برخی اجزا از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر آنتی بادی علیه HIV-1 and 2 و HCV و آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B(HBsAg) ، منفی گزارش شده اند، ولی از آنجایی که هیچ آزمایشی نمی تواند به طورکامل ایمنی یک نمونه با منشاء انسانی را تضمین نماید، با آن همانند یک نمونه بالقوه عفونی رفتار نمایید.

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

۸. برخی از معرف ها حاوی سدیم آزاید به عنوان نگهدارنده می باشند. سدیم آزاید ممکن است با سرب و مس موجود در لوله کشی آب شهری واکنش داده و تولید آزایدهای فلزی قابل انفجار کند. جهت آگاهی از نحوه وارهایی پس ماندهای آزمایشگاهی به "دستورالعمل نحوه مدیریت پسماندهای آزمایشگاهی" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش ۱۳۹۴ مراجعه نمایید.

آماده سازی معرف ها:

۱. همه معرف ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (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 LH 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.

۴. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.

۵. دمای مطلوب محیط آزمایشگاه برای آزمایش های الایزا۲۰ تا۲۷ درجه سانتیگراد می باشد.

۶. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.

۷. بهتراست استانداردها، کنترل ها و نمونه ها را به صورت دوتایی(Duplicate) و ترجیحاً در دو چاهک عمودی آزمایش کنید و میانگین جذب نوری دو چاهک جهت محاسبه نتایج مورداستفاده قرار گیرد.

۸. جهت پیپت کردن محلول سوبسترا-رنگ زا و محلول توقف از میکروپیپت های حاوی ***قطعات فلزی استفاده نکنید***.

۹. زمان های انکوباسیون و دمای انکوباسیون را با دقت رعایت کنید.

۱۰. در کیت LH شرکت پیشگامان سنجش به دلیل استفاده از استرپتاویدین برای پوشاندن کف چاهک، تا زمان افزودن کونژوگه عملاً واکنشی در چاهک رخ نمی دهد، بنابراین، جز خطای ناشی از تبخیر نمونه(در صورتی که ریختن استانداردها، کنترل ها و نمونه ها بیش از۵ دقیقه به طول بیانجامد) خطای قابل توجهی از ناحیه اختلاف زمانی بین ریختن اولین نمونه و آخرین نمونه رخ نمی دهد. با این وجود پیپتینگ چاهک ها با محلول کونژوگه نباید بیشتر از ۵ دقیقه به طول بیانجامد، لذا توصیه می شود، اگر کل پلیت هم زمان ران می شود، برای پرهیز از خطای ناشی از اختلاف زمانی، از تجهیزاتی نظیر دیسپنسر اتوماتیک یا سمپلر هشت کاناله برای ریختن معرف ها استفاده شود یا بیش از شش استریپ در هر بار ران نشود.

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

۱۲. مراحل آزمایش را بدون وقفه انجام دهید. وقفه بین مراحل 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 به مدت 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 به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق(۲۰-۲۷°C) انکوبه کنید.

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

- برای شستشوی چاهک ها، ابتدا ۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک ها را وارونه کرده و همراه با تکان دادن خالی کنید و عمل شستشو را چهار بار دیگر (جمعاً به مدت ۵ بار) تکرار کنید. در انتهای شستشو، با ضربه زدن ملایم پلیت بر روی کاغذ جاذب الرطوبه تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.
- بهتراست برای شستشو از دستگاه های اتوماتیک واشر که قابل برنامه ریزی است استفاده نمایید. که در این صورت به دستورالعمل دستگاه شستشو مراجعه نمایید.

۶- ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترا-رنگ زا آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

۷- ۵۰ میکرو لیتر 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 ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر مرجع استفاده کنید).

۸. 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 که از تمامی نقاط تلاقی عبور کرده باشد،ترسیم کنید.

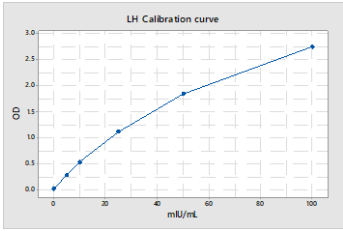
۲. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آن را پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

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 LH 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	mIU/mL	OD
1	0	0.02
2	5	0.28
3	10	0.53
4	25	1.11
5	50	1.84
6	100	2.74



کنترل کیفی:

در هر کیت یک نمونه کنترل وجود دارد که مقادیر موردانتظار برای آن برروی برچسب ویال درج شده است. علاوه بر کنترل داخل کیت، آزمایشگاه می تواند از نمونه های سرم انباشته(Pooled serum) که در خود آزمایشگاه تهیه شده یا نمونه های کنترل خارجی نیز استفاده نماید. در دو حالت یاد شده 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 ۲۰-۵۵ سال) چندین آزمایشگاه مختلف در سطح استان تهران به عمل آمد ، دامنه مرجع زیر برای گروه های مختلف سنی و جنسی براساس درون یابی دامنه بین ۲/۵٪ و ۹۷/۵٪ مرکزی با استفاده از کیت **LH** 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	تعداد(N)	2.5^{th} -97.5^{th} mIU/mL
مرحله فولیکولار	**110**	**1.8-10**
نیمه دوره قاعدگی	**45**	**7-49.0**
مرحله لوتئال	**96**	**0.8-12**
یائسگی	**110**	**7.5-42**
مردان	**115**	**1.0-7.0**
کودکان یک تا ده سال	**82**	**0.5-4.0**

خصوصیات اجرایی کیت

۱- حد پایینی اندازه گیری(Lower limit of measurement):

حد شاهد (Limit-of-Blank: LOB) و حد آشکارسازی (Limit-of-detection: LOD) مطابق با راهنمای EP 17-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI) بدست آمد.

به طور خلاصه حد بلانک تحت عنوان مقدار صدک ۹۵ ام (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. برای تعیین حد آشکارسازی ۲۰ اندازه گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم (n=۲۰×۳=۶۰) با محتوای LH کمتر از 0.5 mIU/mL که مقدار LH 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 و از رابطه زیر حد آشکارسازی معادل 0.1mIU/mL تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645SD_L$$

۲- دقت(Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت LH شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس و ۳ انباشته سرمی تهیه شده از نمونه های بیمار در نقاط مختلف بازه اندازه گیری (1.0-100 mIU/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 (mIU/mL)	Repeatability		Within-Laboratory Precision	
		SD	%CV	SD	%CV
Patient Pool	3.1	0.26	8.39	0.33	10.65
Patient Pool	43	2.8	6.51	1.0	2.33
Patient Pool	72	3.7	5.14	3.1	4.31

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 **LH** پیشگامان سنجش ایساتیس با سایر هورمون های گلیکوپروتئینی **TSH**، **FSH** و **hCG** صورت گرفت. نمونه های حاوی واکنشگرهای متقاطع از طریق **spike** کردن سرم انسانی طبیعی با مواد حاوی سطوح بالایی از همان واکنشگرها به گونه ای که ماتریکس سرم بیش از

۱۰ درصد تغییر نکند، تهیه شد. سپس مقدار **LH** 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 **LH** اولیه بیان گردید. نتایج در جدولی که در ادامه می آید خلاصه شده است:

$$\%\ \text{Cross-reactivity} = \frac{measured\ value - true\ value}{\text{concentration of cross-reactant}} \times 100$$

Tested hormones	Cross Reactivity%	Concentration
FSH	0.05	500 mIU/ml
hCG	0.37	25000 IU/L
TSH	0.18	500 µIU/ml

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

۴- خطی بودن(Linearity):

به منظور ارزیابی خطی بودن یک نمونه با غلظت اولیه 93 mIU/mL را با نمونه دیگری با غلظت 1.3 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 مورد انتظار که از ضرب غلظت اولیه در ضریب رقت بدست آمده بود مقایسه کردیم و میزان بازیابی و سوگرایی را براساس روابطی که در بخش ارزیابی درستی به آن اشاره می شود، در نقاط مختلف محاسبه کردیم، که نتایج در جدول زیر خلاصه شده است.

No	Ratio	Expected (mIU/mL)	Rep 1 (mIU/mL)	Rep 2 (mIU/mL)	recovery %	%Bias
1	**1**	**93**	**91**	**95**	**NA**	**NA**
2	**0.9**	**83.83**	**81.5**	**79**	**95.73%**	**-4.27%**
3	**0.8**	**74.66**	**72**	**79**	**101.13%**	**1.13%**
4	**0.7**	**65.49**	**63**	**60**	**93.91%**	**-6.09%**
5	**0.6**	**56.32**	**52**	**59**	**98.54%**	**-1.46%**
6	**0.5**	**47.15**	**51**	**45**	**101.80%**	**1.80%**
7	**0.4**	**37.98**	**36.2**	**39.7**	**99.92%**	**-0.08%**
8	**0.2**	**19.64**	**21**	**18.5**	**100.56%**	**0.56%**
9	**0.1**	**10.47**	**9.3**	**9.7**	**90.74%**	**-9.26%**
10	**0**	**1.3**	**1.2**	**1.4**	**NA**	**NA**

NA: کاربردی ندارد

۵- درستی(Trueness):

۵-۱- ارزیابی بازیابی(Recovery Evaluation)

ارزیابی خطای سیستماتیک یا بایاس روش به دو صورت انجام گرفت. ابتدا میزان خطای سیستماتیک نسبی (Proportional Error) از طریق مطالعات بازیابی و با افزودن مقادیر مشخص از LH انجام گرفت.

در این ارزیابی مقادیر مشخصی از LH به نمونه های مختلف با محتوای LH متفاوت افزوده و سپس توانمندی سیستم اندازه گیری درتعیین و بازیابی 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 Bias 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 (mIU/mL)	5 mIU/mL added		10 mIU/mL added	
		Recovery %	Bias	Recovery %	Bias
1	5.0	97.6	-1.52%	96.0	-1.90%
2	17.4	104.0	0.89%	101.0	0.36%
3	45.1	106.0	0.60%	108.5	1.54%

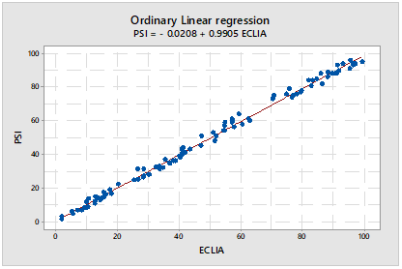
۲-۵- ارزیابی مقایسه ای(Method comparison)

ارزیابی مقایسه ای بین نتایج اندازه گیری کیت سنجش LH سرم شرکت پیشگامان و روش-ECLIA Cobas E411-Roche diagnostic (n=100, range:2.0-99.0) انجام مطابق با راهنمای EP 09-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI) به روش رگرسیون خطی تحلیل گردید. خلاصه نتایج و نمودار رگرسیون خطی در ادامه آورده شده است:

PSI = - 0.0208 + 0.9905 ECLIA

$r = 0.9973$

$r^2 = 0.9945$



٦- پدیده هوک

در این کیت ، اثر هوک تا غلظت2000 mIU/mL دیده نشد.

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. McPherson R.A. et al. (2017). HENRY'S Clinical diagnosis and management by Laboratory Methods. 23rd ed. (pp. 406-408). Elsevier Inc.

6. Pagana K.D. et al. (2018). Mosby's Manual of diagnostic and Laboratory tests.6th ed. (pp. 311-313). Elsevier Inc.

7. Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics.6th ed. (pp. 633-634). 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 بالایWash 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 ۴۰۵nm)	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.

عدم تکرار پذیری مناسب		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.
	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.

INTENDED USE:

The Quantitative Determination of Luteinizing hormone (LH) in Human Serum.

CLINICAL SIGNIFICANCE:

Luteinizing hormone (LH) is a glycoprotein hormone secreted in both men and women from the anterior pituitary gland in response to luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH or Gn-RH), which is released by the hypothalamus. LH, also called interstitial cell-stimulating hormone (ICSH) in men, is a glycoprotein with a molecular weight of approximately 30.000 Daltons. LH Like FSH, hCG and TSH is a heterodimer consist of two non-covalently associated polypeptide chains α and β. Alpha chain is identical in all of these hormone, but β chain is unique in each of them and is responsible for their specific physiological activities and immunological characteristics.

LH and FSH released are secreted in pulsatile and pass through bloodstream to the ovaries, where they stimulate the growth and maturation of follicle and hence the biosynthesis of estrogens and progesterone. The highest level of LH occurs at mid-cycle peak that induce ovulation and formation of corpus luteum, which mainly produces progesterone. Primary function of LH in men is stimulation of the interstitial cells (Leydig cells) to produce testosterone.

LH measurement is used to evaluate dysfunction of the hypothalamus-pituitary-gonads system.

It is always requested in conjunction with FSH if any of the congenital disease with chromosomal abnormalities (e. g. Klinefelter syndrome), polycystic ovaries (PCO) indicated. It is also used to find the cause of amenorrhea, menopausal syndrome, and suspected Leydig cell deficiency.

PRINCIPLE:

The PSI LH EIA Kit is a solid-phase, non-competitive immunoassay based upon the direct sandwich technique. Calibrators, controls and patient samples are incubated together with a biotinylated Anti-LH monoclonal antibody and an HRP-conjugated monoclonal antibody; both recognize LH from different sites, in streptavidin coated microstrips. LH present in calibrators/controls or samples is reacted with both antibodies to form a sandwich complex and also adsorbed to the streptavidin coated microstrips via the biotinylated Anti-LH Mab. 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 LH present in the samples.

Reagent and material supplied in the kit:

Reagent	**Quantity/96 Test KIT**	**Reconstitution**
Microplate (96 breakable wells) coated with streptavidin	96 wells	Ready to Use
Calibrators 1-6 (0,5,10, 25,50and 100 mIU/ml LH) in buffer, containing preservative with traceability to reference material "WHO 2nd International Standard 552/80 "	6 Vial/0.5ml	Ready to Use
Control N = 1 in buffer compatible with human serum matrix with preservatives	1 Vial/0.5 ml	Ready to Use
Enzyme Conjugate (red color)	1 Vial/12 ml	Ready to use
Concentrated Wash solution	1 Vial/30 ml	Dilute 20X with distilled water
Substrate-Chromogenic solution (Tetra-methylbenzedrine and hydrogen peroxide)	1 Vial/12ml	Ready to Use
Stop solution (H2So4 0.12M) Additional information about other additive is considered proprietary.	1 Vial/6.0 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
- Precise micropipettes for delivery of 20, 50, 100, microliters. An 8-channel pipette or respenser pipette with disposable plastic tips for delivery of 50-200 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 wavelength of 450 nm and 620-650 nm, and an absorbance range of 0-3.0

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 their label.
- Calibrators' concentration is displayed on the vial labels and may vary between lots.
- Do not freeze kit components.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the preparation day.
- Each lot of reagents and calibrators has been standardized to produce the correct reaction. Do not interchange the reagents or calibrators between lots.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration. Chromogenic solution TMB should be colorless. Blue color indicates that the reagent has been contaminated and should be discarded.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Human serum and EDTA plasma are samples of choice for PSI LH kit.
- Do not use grossly haemolysed or turbid samples.
- 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

Safety

- For Professional in vitro diagnostic use only.
- All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of LH in human serum. The kit is not calibrated for the determination of LH in urine, Non-EDTA plasma or other specimens of human or animal origin.

- Before starting the assay, read the working manual 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 reagents 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 are potentially infectious.

Preparation of reagents

Wash Buffer:

According to the required volume, 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 gain 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 the expiry date.
- Do not mix up vial caps.
- Bring all the reagents to room temperature prior to use.
- Thoroughly mix all reagents, calibrators/controls and samples by gentle agitation or swirling.
- Assay calibrators, controls and samples 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 addition of each reagent and sample.
- For the dispensing of Chromogenic solution 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%

- Although, PSI LH EIA kit uses streptavidin coated plate technology and reaction does not proceed before adding conjugate solution, but to 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 final results.
- Draw a calibration curve for each run, do not use stored curve from previous runs.
- Incubation with Chromogenic solution must be done in the dark.
- Only standard zero may be used to dilute any high serum samples. The use of any other reagent may lead to false results.
- 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.

Measuring Procedure

1. Transfer the required number of microplate strips to a strip frame. (Immediately return the remaining strips to the aluminum pouch containing a desiccant, reseal carefully and store at 2-8°C.
2. Pipette 20 µL of each Calibrator (calibrators 0, 5, 10, 25, 50, 100 mIU/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 15 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.

i. Carefully dispense 350 µL of working wash solution into each well.
ii. Aspirate the content of each well.
iii. Repeat 4 additional wash for a total of 5 wash cycles.
iv. After the 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 nm) 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.*

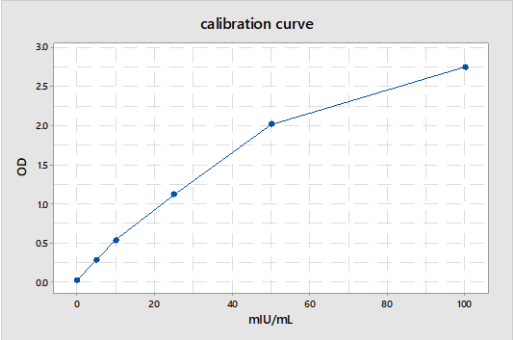
CALCULATION OF RESULTS

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 the best fit curve through the points on the graph.
2. To determine concentration of LH 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 calibrator. For automatic calculation of LH 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	Standards mIU/ml
0.02	0
0.28	5
0.53	10
1.11	25
2.01	50
2.74	100



Quality control

LH control serum should be used for validation of the assay series. Range of expected results are indicated on the vial label. If assigned range is 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 own serum pools at different levels, which can be used as internal controls in order to ensure the precision of the assay.

Expected values

A study with PSI LH EIA kit was performed using samples from some apparently healthy people and 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 does not match, determine its own reference interval:

Phase of menstrual cycle	**2.5^{th} -97.5 percentile (mIU/mL)**
Follicular phase	**1.8 - 10**
Mid-cycle	**7.0-49**
Luteal phase	**0.8-12**
Post-Menopause	**7.5-42 mIU/ml**

Male	**1.0-7.0mIU/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 zero over several runs. The Limit of blank equals to the concentration that 95% of the repeated measurements on zero standard give value below it. In the next step, we determined standard deviation of the repeated measurements on three samples with LH contents less than 1.0 mIU/mL determined from a separate method study (ECLIA Method). By adding, the LOB calculated at first step to 1.645 times the greatest standards deviation calculated in the second step ($LOD = LOB + 1.645SD_L$) LOD calculated as 1.0 mIU/mL

Specificity:

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

Tested hormones	Cross Reactivity%	Concentration
FSH	**0.05**	**500 mIU/ml**
hCG	**0.37**	**25000 IU/L**
TSH	**0.18**	**500 µIU/ml**

Also interference evaluation from common sample abnormalities, hemolysis, Lipemia and icterus were performed according to aforementioned document and 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**

Precision:

Precision was determined using PSI LH EIA kit reagents and three pooled human sera according to EP05-A3 Guideline.

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

Sample Description	Mean (mIU/mL)	Repeatability		Within-Laboratory Precision	
		SD	%CV	SD	%CV
Patient Pool	3.1	0.26	8.39	0.33	**10.65**
Patient Pool	43	2.8	6.51	1.0	**2.33**
Patient Pool	72	3.7	5.14	3.1	**4.31**

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 mIU/mL LH as a high sample was diluted with another sample with 1.3 mIU/mL in different proportions and their LH was measured in duplicate on each dilution. Measured values were compared with expected values, which were estimated by dilution formula, then percentage bias and percentage recovery were calculated for each concentration. The following results are obtained:

No	Ratio	Expected (mIU/mL)	Rep 1 (mIU/mL)	Rep 2 (mIU/mL)	recovery%	%Bias
1	**1**	93	**91**	**95**	**NA**	**NA**
2	**0.9**	83.83	**81.5**	**79**	95.73%	-4.27%
3	**0.8**	74.66	**72**	**79**	101.13%	1.13%
4	**0.7**	65.49	**63**	**60**	93.91%	-6.09%
5	**0.6**	56.32	**52**	**59**	98.54%	-1.46%
6	**0.5**	47.15	**51**	**45**	101.80%	1.80%
7	**0.4**	37.98	**36.2**	**39.7**	99.92%	-0.08%
8	**0.2**	19.64	**21**	**18.5**	100.56%	0.56%
9	**0.1**	10.47	**9.3**	**9.7**	90.74%	-9.26%
10	**0**	1.3	**1.2**	**1.4**	**NA**	**NA**

NA: Not applicable

Method comparison:

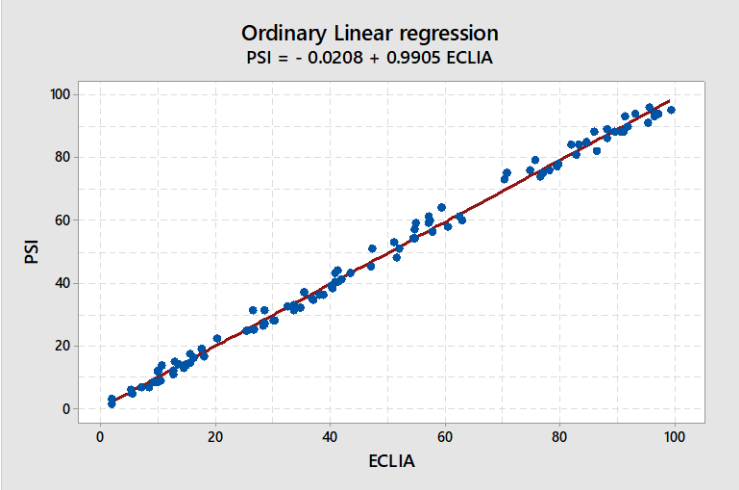
A comparison of the PSI LH EIA kit (y axis) using patient samples (n=100 range:2.0-99.0 mIU/mL) with ECLIA-Cobas E411-Roche diagnostic (X axis) gave the following results by ordinary Liner regression:

The regression equation is

PSI = - 0.0208 + 0.9905 ECLIA

$r = 0.9973$

$r^2 = 0.9945$



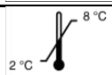
High dose Hook effect:

High dose Hook effect has not seen up to 2000 mIU/mL.

References:

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. **Scott M.G. et al. (1989). Hormonal evaluation of female infertility and reproductive disorders. Clin. Chem. 1989. 35:620-30**

SYMBOLS:

	BATCH NUMBER
	USE BY
	MANUFACTURER
	CONTAINS SUFFICIENT FOR <n> TESTS
	***IN VITRO* DIAGNOSTIC MEDICAL DEVICE**
	**TEMPERATURE LIMITATION**
	CATALOGUE NUMBER
	CONSULT INSTRUCTIONS FOR USE

Procedure in-brief