

IVD-REF: PS – T4	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الیزا T4
Ver. No: 05		T4 ELISA KIT

آماده سازی	192 تستی	96 تستی	48 تستی	معرف
آماده مصرف	2×96 wells	1×96 wells	1×48 wells	پلیت پوشیده شده با آنتی بادی علیه تیروکسین
آماده مصرف	6 ×1.0 mL	6 ×0.5 mL	6 ×0.5 mL	کالیبراتور 1-6 (0، 2/5، 5، 10، 15، 30 µg/dL) در بافر، به همراه نگهدارنده
آماده مصرف	1 ×1.0 mL	1 ×0.5 mL	1 ×0.5 mL	نمونه کنترل در بافر سازگار با سرم انسانی همراه با نگهدارنده) بازه قابل قبول سرم کنترل بر روی برجسب قید شده است)
آماده مصرف	2 ×12.0 mL	1 ×12.0 mL	1 ×6.0 mL	کونژوگه T4-HRP (قرمز رنگ)
به نسبت 1 به 20 با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید	1 ×50 mL	1 ×30 mL	1 ×30 mL	محلول شستشو غلیظ
آماده مصرف	2 ×12.0 mL	1 ×12.0 mL	1 ×6.0 mL	محلول سوبسترا-رنگ زا (تترامتیل بنزدین و آب اکسیژنه)
آماده مصرف	1 ×12.0 mL	1 ×6.0 mL	1 ×6.0 mL	محلول توقف (اسید کلریدریک 1 مولار)

IVD-REF: PS – T4	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش تشخیصی و تشخیصی	کیت الایزا T4
Ver. No: 05		T4 ELISA KIT

کاربرد:

کیت **T4 ELISA Kit** شرکت پیشگامان سنجش ایستاسیس برای اندازه گیری کمی تیروکسین تام یا **Total Thyroxine** در سرم یا پلاسما طراحی گردیده است.

مقدمه :

دو هورمون تیروکسین (**T4**) و تری یدوتیرونین (**T3**) توسط غده تیروئید تولید و وارد خون می شوند. فقط مقدار ناچیزی هورمون **T3** مستقیماً توسط تیروئید ساخته می شود و قسمت اعظم آن توسط آنزیم '5-یدیناز در نسوج از برداشتن یک اتم ید از تیروکسین ساخته می شود. لذا به نظر می رسد تیروکسین عمدتاً به عنوان منبع ذخیره و پیش ساز هورمون **T3** که فعال ترین فرم بیولوژیک هورمون های تیروئیدی است، عمل می کند. قسمت اعظم تیروکسین موجود در خون به صورت متصل به پروتئینهای **TBG**، پره آلبومین و آلبومین منتقل می شود و فقط پنج صدم درصد آن به صورت آزاد است. محرک اصلی تولید هورمون تیروکسین هورمون تیروتروپین یا **TSH** مترشح از هیپوفیز است که خود تحت کنترل هورمون آزادکننده تیروتروپین ، که از هیپوتالاموس ترشح می شود، می باشد.

هورمون های تیروئیدی باعث تقویت بسیاری از اعمال داخل سلولی شده و رشد و تمایز سلول را پیش می برند. هورمون های تیروئیدی مصرف اکسیژن و تولید **ATP**، متابولیسم میتوکندریال، سنتز و متابولیسم کربوهیدرات ها، سنتز و تجزیه کلسترول و تری گلیسریدها (به عنوان مثال از طریق تنظیم بیان پذیرنده **LDL** در کبد)، حساسیت بافت به کاتکول آمین ها را افزایش می دهد. همچنین باعث افزایش ضربان قلب و انقباض پذیری عضلات قلب می گردد. علاوه بر موارد یادشده هورمون های تیروئیدی در تنظیم متابولیسم کلسیم و فسفر رشد و نمو جنین و کودکان نقش مهمی ایفاء می کند.

مقدار هورمون **T4** در پر کاری تیروئید افزایش و در کم کاری تیروئید کاهش می یابد، که به ترتیب ممکن است با کاهش یا افزایش **TSH** همراه باشد. عواملی نظیر حاملگی یا مصرف قرص های ضدبارداری خوراکی که باعث افزایش غلظت پروتئینهای اتصالی هورمون تیروئیدی می گردند، می توانند باعث افزایش میزان تیروکسین تام سرم شوند، در حالی که مقدار هورمون تیروکسین آزاد در این افراد طبیعی است. در این افراد معمولاً **TSH** در دامنه مرجع قرار دارد.

اساس آزمایش :

مبنای کیت سنجش **T4** شرکت تولیدی-تحقیقاتی پیشگامان سنجش ایستاسیس بر پایه اصول الایزا رقابتی می باشد. در این کیت تیروکسین موجود در استاندارد/کنترل/نمونه بیمار با تیروکسین کونژوگه با آنزیم **HRP** برای

IVD-REF: PS – T4	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه تخصصی تشخیص و تست‌آوری	کیت الایزا T4
Ver. No: 05		T4 ELISA KIT

اتصال و اشغال جایگاه های اختصاصی آنتی بادی ضد تیروکسین متصل به فاز جامد (چاهک میکروتیتر) به رقابت می پردازند. هرچه مقدار تیروکسین موجود در نمونه بیشتر باشد، جایگاه های بیشتری از آنتی بادی فاز جامد را اشغال می کند در ادامه با شستشو اجزاء اتصال نایافته از محیط خارج و با افزودن محلول سوپسترا - رنگزا و انکوباسیون به مدت 15 دقیقه رنگ آبی ظاهری شود. 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 T4 موجود در سرم نسبت معکوس دارد.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

1. سمپلهای 25، 50 و 100 میکرولیتری دقیق. سمپلر 8 کاناله با قابلیت پیپتینگ 50 تا 100 میکرولیتر و دیسپنسر اتوماتیک، اگرچه ضروری نیست ولی باعث بهبود قابل توجه تکرارپذیری و صحت نتایج می گردد.
2. آب مقطر با هدایت الکتریکی مطلوب کم تر از $1 \mu\text{s}/\text{cm}$
3. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر 450 نانومتری و در صورت امکان 630 نانومتری بعنوان فیلتر فرانس.
4. کاغذ جاذب رطوبت
5. دستگاه و اشتر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر 8 کاناله یا سرنگ که قادر به ریختن 350 میکرولیتر محلول شستشو باشد.

نگهداری کیت :

1. کیت پس از تحویل باید در دمای 2-8 درجه سانتی گراد (یخچال) نگهداری شود. کلیه معرف ها و اجزاء کیت تا تاریخ انقضاء مندرج بر روی جعبه کیت، به شرط نگهداری در دمای یادشده، پایدار هستند. هرگز فراتر از تاریخ انقضاء مندرج بر روی جعبه از کیت استفاده نکنید.
2. غلظت کالیبراتورها و نیز دامنه قابل قبول نمونه های کنترل بر روی ویال درج شده است و ممکن است بین شناسه های مختلف ساخت تفاوت داشته باشد.
3. از انجماد کیت یا اجزاء کیت خودداری نمایید.
4. میکروپلیت باید در کیسه در بسته به همراه نمگیر نگهداری شود. در هنگام استفاده پس از رسیدن دمای کیسه میکروپلیت به دمای اتاق، تعداد لازم استریپ را از کیسه آلومینیومی خارج و مابقی همراه نم گیر بلافاصله به کیسه منتقل و درب کیسه با دقت بسته و به یخچال منتقل گردد.
5. محلول شستشو باید روزانه و تازه تهیه شود و در همان روز تهیه مصرف شود.

IVD-REF: PS – T4	 <p>پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تست‌های آوری</p>	کیت الیزا T4
Ver. No: 05		T4 ELISA KIT

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 سوپسترا-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 ترجیحاً استفاده نشود.
3. در صورتی که انجام آزمایش در همان روز جمع آوری نمونه امکان پذیر نباشد، نمونه ها را می توان برای مدت 48 ساعت در دمای 2 تا 8 درجه سانتیگراد نگه داری کرد. برای مدت طولانی تر نمونه ها باید در 20°C - 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 T4 سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده اند و برای سنجش T4 سایر مایعات بیولوژیک یا پلاسمای غیر EDTA مناسب نمی باشد.
3. قبل از آغاز سنجش، دستورالعمل پیش رو را بدقت مطالعه نموده و اطمینان حاصل کنید که تمامی نکات آن را بخوبی فرا گرفته اید. همواره از ویرایش معتبر و به روز دستورالعمل که همراه کیت بسته بندی شده است، استفاده کنید.

IVD-REF: PS – T4	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص‌های و تست‌های آزمایشگاهی	کیت الیزا T4
Ver. No: 05		T4 ELISA KIT

4. کلیه جوانب ایمنی در اجرای آزمایش رعایت شود. برای آگاهی از احتیاطات لازم به "راهنمای اصول کلی حفاظت و پیشگیری از آلودگی کارکنان و محیط آزمایشگاه (روش های صحیح میکروب شناسی و تکنیک های صحیح آزمایشگاهی)" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش 1393 مراجعه نمایید.

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

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

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

8. برخی از معرف ها حاوی سدیم آزاید به عنوان نگهدارنده می باشند. سدیم آزاید ممکن است با سرب و مس موجود در لوله کشی آب شهری واکنش داده و تولید آزیدهای فلزی قابل انفجار کند. جهت آگاهی از نحوه وارهایی پس ماندهای آزمایشگاهی به "دستورالعمل نحوه مدیریت پسماندهای آزمایشگاهی" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش 1394 مراجعه نمایید.

آماده سازی معرف ها:

1. همه معرف ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (27-20 درجه سانتیگراد) برسند.
2. تهیه محلول شستشو: برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با 19 حجم آب مقطر رقیق نمایید.

نکات مهم در انجام تست:

1. فرایند شستشو از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. شستشوی ناکافی باعث عدم جدا شدن 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 T4 نمونه بیش از $30 \mu\text{g/dL}$ باشد، نمونه را با یک سرم دیگر با محتوای تیروکسین پایین رقیق و سپس آزمایش را تکرار نموده و مقدار تیروکسین را در نمونه اولیه محاسبه کنید در نظر داشته باشید که

IVD-REF: PS – T4	 <p>پیشگامان سنجش پیشگامان در زمینه تشخیص‌های تشخیصی و تست‌های</p>	کیت الایزا T4
Ver. No: 05		T4 ELISA KIT

در محاسبه مقدار تیروکسین نمونه بالا محتوای تیروکسین نمونه ای را که برای رقیق سازی انتخاب کرده اید را نیز مدنظر قرار دهید .

4. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.
5. دمای مطلوب محیط آزمایشگاه برای آزمایش های الایزا 20 تا 27 درجه سانتیگراد می باشد.
6. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.
7. بهتر است استانداردها، کنترل ها و نمونه ها را به صورت دوتایی (Duplicate) و ترجیحاً در دو چاهک عمودی آزمایش کنید و میانگین جذب نوری دو چاهک جهت محاسبه نتایج مورد استفاده قرار گیرد.
8. جهت پیمت 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. برای اجتناب از بروز خطای رانش یا Drift ناشی از اختلاف زمانی انجام واکنش در چاهک های ابتدایی با چاهک های انتهایی، 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.
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 بر روی آنها ممکن است به حصول پاسخ های کاذب بیانجامد.

روش انجام آزمایش:

- 1- تعداد مناسب چاهک های پوشیده شده از آنتی تیروکسین، برای استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار را بصورت دوتایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده نمگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.
- 2- 25 میکرولیتر از استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار به داخل هر چاهک بریزید.

IVD-REF: PS – T4	 <p>پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی</p>	کیت الیزا T4
Ver. No: 05		T4 ELISA KIT

3- 100 میکرولیتر از محلول کونژوگه T4-HRP، به تمام چاهک‌ها اضافه کنید.

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

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

- برای شستشوی چاهک‌ها، ابتدا 350 میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک‌ها را وارونه کرده و همراه با تکان دادن خالی کنید و عمل شستشو را چهار بار دیگر (جمعاً به مدت 5 بار) تکرار کنید. در انتهای شستشو، با ضربه زدن ملایم پلیت بر روی کاغذ جاذب الرطوبه تمامی مایع موجود در چاهک‌ها را تخلیه نمایید.

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

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

7- 50 میکرو لیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش به همان ترتیبی که محلول سوبسترا-رنگ‌زا اضافه نمودید، به همه چاهک‌ها اضافه کنید. سپس حداکثر ظرف مدت 10 دقیقه جذب نوری هر چاهک را در طول موج 450 نانومتر با دستگاه الیزا ریدر قرائت نمایید (در صورت امکان از طول موج 630 نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید).

محاسبه نتایج:

1. با استفاده از میانگین جذب نوری استاندارد‌ها بر روی محور عمودی (محور **Y**) و غلظت مشخص آنها بر روی محور افقی (محور **X**) بر روی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد را از طریق ترسیم خطوطی که از تمامی نقاط تلاقی عبور کرده باشد، ترسیم کنید.

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.

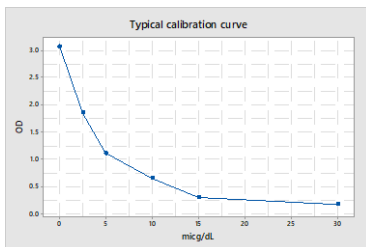
3. در صورتی از اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت که مجهز به سیستم پردازش داده‌های داخلی است استفاده می‌کنید، جهت محاسبه نتایج و ترسیم منحنی کالیبراسیون به دستورالعمل دستگاه مراجعه نمایید. برای محاسبه نتایج کیت **T4** شرکت پیشگامان سنجش از مدل محاسباتی نقطه-به-نقطه (**Point-to-point**) استفاده کنید.

IVD-REF: PS – T4	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش تشخیصی و تشخیصی	کیت الیزا T4
Ver. No: 05		T4 ELISA KIT

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	$\mu\text{g/dL}$	OD
1	0.0	3.070
2	2.5	1.850
3	5.0	1.112
4	10.0	0.650
5	15.0	0.298
6	30.0	0.174



کنترل کیفی:

در هر کیت یک نمونه کنترل وجود دارد که مقادیر موردانتظار برای آن بر روی 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 مشروط به پایداری نمونه طی روزهای اجرای برنامه کنترل کیفی داخلی، نیز استفاده نماید. در دو حالت یادشده لازم به ذکر است که آزمایشگاه باید مقدار هدف، انحراف معیار نتایج و کرانه های بالایی (UCL) و پایینی (LCL) قابل قبول را خود محاسبه و مبنای برنامه های کنترل کیفی خویش قرار دهد.

بازه مرجع:

در یک بررسی که بر روی سرم تعدادی از مراجعه کنندگان چندین آزمایشگاه مختلف در سطح استان تهران به عمل آمد، دامنه مرجع زیر با استفاده از کیت T4 الیزا 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

IVD-REF: PS – T4	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الیزا T4
Ver. No: 05		T4 ELISA KIT

آزمایشگاهی باید ابتدا انتقال پذیری (**transferability**) این داده ها را در خصوص جمعیت موردنظر خویش راستی آزمایی (**Verification**) کرده و در صورت مشاهده نا همخوانی، بازه مرجع خود را بدست آورد:

4.5-12.5	محدوده طبیعی ($\mu\text{g/dL}$)
----------	-----------------------------------

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 (**95th percentile**) از 60 بار اندازه گیری بر روی نمونه شاهد (استاندارد صفر) طی چندین ران بدست آمد. حد شاهد (**LoB**) معادل غلظتی درنظر گرفته شد که 95٪ از 60 نتیجه اندازه گیری های تکراری مقداری کمتر از آن بدست دهد. برای تعیین حد آشکارسازی 20 اندازه گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم ($n=20 \times 3=60$) با محتوای **T4** کمتر از $2 \mu\text{g/dL}$ که مقدار **T4** آن به روش مستقل دیگری تعیین شده بود طی سه روز انجام شد و بزرگترین انحراف معیار اندازه گیری های تکراری بر روی سه نمونه یادشده مبنای تعیین حد آشکارسازی قرار گرفت. از رابطه زیر حد آشکارسازی پس از گرد کردن روبه بالا معادل **1.0 $\mu\text{g/dL}$** تعیین گردید.

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

2- دقت (**Precision**):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت **T4** شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس و 3 انباشته سرمی تهیه شده از نمونه های بیمار، در سه نقطه مختلف بازه اندازه گیری مطابق با راهنمای **EP 05-A3** مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (**CLSI**) بدست آمد.
 طی 10 روز کاری، سه کاربر و هر یک روزانه سه ران اندازه گیری های تکراری به صورت دوتایی در هر ران بروی نمونه های یاد شده انجام دادند ($2 \times 3 \times 3 \times 10$). نتایج با روش آماری **Fully nested ANOVA** تحلیل گردید: خلاصه نتایج در جدول زیر آورده شده است:

IVD-REF: PS – T4	 پیشگامان سنجش پیشگامان در تشخیص‌های و تست‌های آزمایشگاهی	کیت ایزا T4
Ver. No: 05		T4 ELISA KIT

Sample Description	Mean (µg/dL)	Repeatability		Within-Laboratory Precision	
		SD	%CV	SD	%CV
Patient Pool	3.82	0.39	10.21	0.24	6.28
Patient Pool	8.1	0.43	5.31	0.68	8.40
Patient Pool	13.7	1.07	7.81	0.39	2.85

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 T4 پیشگامان سنجش ایساتیس با سایر ترکیبات مشابه هورمون T4 انجام گرفت. نمونه های حاوی واکنشگرهای متقاطع از طریق spike کردن سرم انسانی طبیعی با مواد حاوی سطوح بالایی از همان واکنشگرها به گونه ای که ماتریکس سرم بیش از 10 درصد تغییر نکنند، تهیه شد. سپس مقدار T4 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 T4 اولیه بیان گردید. نتایج در جدولی که در ادامه می آید خلاصه شده است:

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

Cross-reactants	% Cross-reaction
T3(3,3',5-triiodothyronine)	1.5
rT3(3, 3', 5'-triiodothyronine, Reverse T3)	1.3
3,5-diiodothyronine	<0.1

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

4- خطی بودن (Linearity):

ارزیابی خطی بودن از طریق رقیق سازی متوالی سه نمونه با محتوای تیروکسین مختلف با ماتریکس پروتئینی عاری از تیروکسین و مقایسه نتایج حاصل از سنجش تیروکسین بر روی نمونه های رقیق شده (Observed value) با

IVD-REF: PS – T4	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش تشخیصی و تست‌های ژنتیکی	کیت الیزا T4
Ver. No: 05		T4 ELISA KIT

نتایج موردانتظار که از ضرب مقدار تیروکسین اولیه در ضریب رقت بدست آمده بود (Target value)، انجام پذیرفت. نتایج در جدول زیر خلاصه شده است.

Samples	Primary concentration (µg/dL)	Recovery %		
		1:2	1:4	1:8
1	15.5	105	96.9	97.5
2	14.7	103	98.6	94.2
3	16	97.5	96.5	98.6

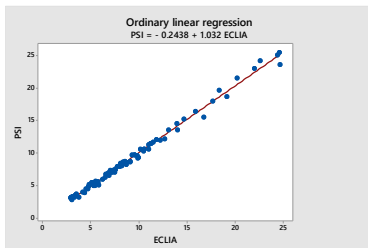
5- درستی (Trueness):

5-1- ارزیابی مقایسه ای (Method comparison)

ارزیابی مقایسه ای بین نتایج اندازه گیری کیت سنجش T4 سرم شرکت پیشگامان و روش ECLIA-EP Cobas E411-Roche diagnostic (n=80 range: 2.1-26.2 µg/dL) انجام و مطابق با راهنمای EP 09-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) به روش رگرسیون خطی تحلیل گردید. در این ارزیابی نتایج کیت پیشگامان بر روی محور عمودی (محور yها) و نتایج روش ECLIA بر روی محور افقی (محور xها) مشخص و نمودار رگرسیون خطی ترسیم گردید. خلاصه نتایج و نمودار رگرسیون خطی (Linear regression) در ادامه آورده شده است:

$$PSI = -0.2438 + 1.032ECLIA$$

$$R-sq = 0.9934$$



IVD-REF: PS – T4	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه تخصصی تشخیص و تست‌های آنتی‌بیوتیک	کیت الایزا T4
Ver. No: 05		T4 ELISA KIT

منابع و مراجع:

1. CLSI. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline. 2nd ed. CLSI document EP 17-A2. Pierson-Perry J.F. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2012.
2. CLSI. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline. CLSI document EP 05-A3. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2014.
3. CLSI. Interference Testing in clinical chemistry; approved guideline. 2nd ed. CLSI document EP07-A23. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2005.
4. Kasper D.L. et al. (2015). Harrison's principles of internal medicine. 19th ed. (pp. 2285-6). McGraw Hill Education
5. Pagana K.D. et al. (2018). Mosby's Manual of diagnostic and Laboratory tests. 6th ed. (pp. 442-4). Elsevier Inc.
6. Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics. 6th ed. (pp. 1580) Elsevier Inc.

IVD-REF: PS – T4	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش تشخیصی و تشخیصی	کیت الیزا T4
Ver. No: 05		T4 ELISA KIT

خطایابی در آزمایش های الیزا

راه حل	علت مشکل	نوع مشکل
تکرار تست با کونژوگه جدید	افت و یا آلودگی کونژوگه	پایین بودن OD استاندارد ها و نمونه ها
1.دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید. 2.قبل از شروع آزمایش کیت و نمونه بیماران به دمای اتاق برسد.	پایین بودن دما و یا کوتاه بودن زمان انکوباسیون، به دما نرسیدن محلولهای کیت و نمونه بیماران	
1.PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. 2.پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer. شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	
1.پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. 2.پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	
1.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. 2.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.	طول موج خوانش نامناسب (405 nm بجای 450nm)	
از سری استاندارد جدید استفاده کنید.	آلودگی استاندارد ها	صحیح نبودن نمودار استاندارد ها
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.	پیتینگ نامناسب	

IVD-REF: PS – T4	 پیشگامان سنجش پیشگامان در زمینه تشخیص‌های تشخیصی و تست‌های	کیت الیزا T4
Ver. No: 05		T4 ELISA KIT

4. توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود.		
1. PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. 2. پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید.	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها	
تکرار تست با استاندارد های جدید	آلودگی استاندارد صفر	بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD
استفاده از محلول رنگزا جدید	آلودگی محلول رنگزا	
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 واش را چک کنید.	آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نامناسب	
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.	طول موج نامناسب در خوانش	
تکرار تست با محلول Stop جدید	آلودگی محلول Stop	عدم تولید رنگ در چاهک‌ها
تکرار تست با مواد همان کیت	استفاده از مواد سایر کیت‌ها	
تکرار تست	انجام نشدن مرحله ای از تست	
تکرار تست با محلول رنگزا جدید	آلودگی محلول رنگزا	
تکرار تست با محلول کونژوگه جدید	آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید	

IVD-REF: PS – T4	 پیشگامان سن‌جش پیشگامان در تشخیص‌های و تست‌های آلودگی	کیت الیزا T4
Ver. No: 05		T4 ELISA KIT

<p>1. استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف</p> <p>2. از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید</p> <p>3. توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد.</p> <p>4. توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نشود.</p> <p>5. توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد.</p> <p>6. کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلر ها</p>	<p>پیپتینگ نامناسب، گرفتگی لوله داخلی سمپلر بواسطه آلودگی</p>	<p>عدم تکرار پذیری مناسب</p>
<p>فاصله زمانی بین اضافه کردن استاندارد ها و نمونه نباید بیشتر از 10 دقیقه باشد. در این صورت نتایج قابل اعتماد نیست.</p>	<p>طولانی شدن زمان انجام تست</p>	
<p>پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید.</p>	<p>نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد</p>	
<p>پیپتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.</p>	<p>باقی ماندن کونژوگه در لبه چاهکها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک ها</p>	
<p>در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک ها نباشد.</p>	<p>وجود حباب در چاهک ها</p>	
<p>کف چاهکها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید.</p>	<p>کثیف بودن کف چاهکها</p>	
<p>قبل از استفاده، ویال محلول ها را به آرامی تکان دهید.</p>	<p>مخلوط نشدن محلول های کیت</p>	

IVD-REF: PS – T4	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص‌های و تست‌های آنتی	کیت الایزا T4
Ver. No: 05		T4 ELISA KIT