معرف	۴۸ تستی	۹۶ تستی	۱۹۲ تستی	آماده سازی
پلیت پوشیده شده با استرپتاویدین	1×48 wells	1×96 wells	2×96 wells	آماده مصرف
کالیبراتور ۱-۶ (۰، ۰/۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۵ µIU/mL) در بافر، به همراه نگهدارنده با قابلیت ردیابی نسبت به ماده مرجع WHO 2nd IRP 80/558	6 ×0.5 mL	6 ×1.0 mL	6 ×2.0 mL	آماده مصرف
نمونه های کنترل در بافر سازگار با سرم انسانی همراه با نگهدارنده(بازه قابل قبول سرم کنترل برروی برچسب قید شده است)	2 ×0.5 mL	2 ×1.0 mL	2 ×2.0 mL	آماده مصرف
رقیق کننده نمونه(sample diluent)	1 ×2.5 mL	1 ×2.5 mL	1 ×2.5 mL	آماده مصرف
کونژوگه (قرمز رنگ)	1 ×3.0 mL	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول شستشو غلیظ	1 ×30 mL	1 ×30 mL	1 ×50 mL	به نسبت ۱ به ۲۰ با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید
محلول سوبسترا-رنگ زا (تترامتیل بنزیدین و آب اکسیژنه)	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	2 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول توقف (اسید کلریدریک ۱ مولار)	1 ×6.0 mL	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف

کاربرد:

کیت TSH ELISA Kit شرکت پیشگامان سنجش برای اندازه گیری کمی هورمون محرکه تیروئیدی یا تیروتروپین یا Thyroid Stimulating Hormone در سرم یا پلاسما به روش الایزا طراحی گردیده است.

مقدمه :

تعیین مقدار تیروتروپین یا TSH جهت تشخیص افتراقی کم کاری اولیه و ثانویه تیروئید مورد سنجش قرار می گیرد. ترشح TSH از هیپوفیز به کمک هورمون آزاد کننده تیروئید (Thyroid Releasing Hormone or TRH) مترشحه از هیپوتالاموس تحریک می شود. سطوح پایین **تری‌یدوتیرونین** (T_3) و تیروکسین (T_4) محرک اولیه ترشح TRH و TSH محسوب می شوند. سنجش مقدار TSH سرم به عنوان معیار پایش هورمون درمانی یا مهار ترشح هورمون در کم کاری و پر کاری تیروئید به شمار می رود. در پرکاری تیروئید اولیه، غده تیروئید مقادیر زیادی T3 و T4 تولید می کند که از طریق مهار بازخورد منفی، ترشح TSH را از هیپوفیز قدامی سرکوب می کند. در حالی که در شرایط کم کاری تیروئید اولیه، نظیر آنچه که در بیماری نظیر هاشیموتو ، تخریب ناشی از جراحی یا قرار گرفتن در معرض مواد رادیو اکتیو ، التهاب تیروئید، رشد ناکافی تیروئید، کم کاری آیدیوپاتیک تیروئید، کرتینیسم مادرزادی رخ می دهد، تیروئید مقادیر ناکافی T3 و T4 تولید می کند که منجر به از بین رفتن بازخورد منفی و افزایش تولید TSH می شود.

در پرکاری تیروئید ثانویه، هیپوفیز قدامی مقادیر زیادی TSH تولید می کند که به نوبه خود سلول های فولیکولی تیروئید را تحریک می کند تا هورمون های تیروئید را در مقادیر بیش از حد ترشح کنند. در کم‌کاری تیروئید ثانویه غده هیپوفیز قدامی سطوح پایینی از TSH تولید می کند، در نتیجه عدم تحریک سلول‌های فولیکولی تیروئید باعث کاهش سطح T3 و T4 می‌شود.

سنجش TSH جهت تشخیص کم کاری اولیه در نوزادان که آزمون غربالگری آنها مقادیر بسیار پایین T_4 را نشان می دهد، نیز مورد استفاده قرار می گیرد. سنجش TSH و T_4 برای تشخیص افتراقی

نارسایی عملکرد تیروئید و هیپوفیز مورد استفاده قرار می گیرد. کاهش T_4 همراه با TSH طبیعی یا افزایش آن بر اختلال تیروئید و کاهش T_4 همراه با کاهش TSH بر نارسایی هیپوفیز دلالت دارد.

اساس آزمایش :

کیت سنجش TSH شرکت تولیدی، تحقیقاتی پیشگامان سنجش ایساتیس بر مبنای اصول الایزا نوع ساندویچ عمل می کند. در این کیت از فن آوری استرپتاویدین در پوشاندن فاز جامد استفاده شده است. به طور خلاصه، استاندارد یا کنترل یا نمونه بیمار هم زمان با معرف کونژوگه که حاوی دو نوع آنتی بادی علیه TSH یکی کونژوگه با بیوتین و دیگری کونژوگه با آنزیم HRP است و TSH را از دو جایگاه متفاوت شناسایی می کنند به چاهک های پوشیده شده از استرپتاویدین اضافه می شوند. TSH موجود در استاندارد/کنترل/ نمونه بیمار بین دو آنتی بادی به حالت ساندویچ در آمده و مجموعه از طریق بیوتین به استرپتاویدین فاز جامد متصل می شود. سپس اجزای متصل نشده 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. شدت جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری می شود. شدت رنگ تولید شده با مقدار TSHموجود در سرم نسبت مستقیم دارد .

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

۱. سمپلرهای 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 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$-۲۰^{\circ}C$ 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 آزمایشگاهی کاربرد دارد.

۲. کلیه معرف های کیت برای سنجش مستقیمTSH سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده اند و برای سنجش TSH 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 بخوبی فرا گرفته اید. همواره از ویرایش معتبر و به روز دستورالعمل که همراه کیت بسته بندی شده است، استفاده کنید

۴. 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 ۱۳۹۳ مراجعه نمایید.

۵. از تماس تمام معرف ها به ویژه محلول متوقف گر 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 طور کامل 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 دفع پسماندهای 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.

۹. این کیت به روش دستی (غیر دستگاهی) می باشد ، برای انجام تست با روش دستگاهی با کارشناسان فنی این شرکت تماس حاصل نمایید.

آماده سازی معرف ها:

۱. همه معرف ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (۲۷-۲۰درجه سانتیگراد) 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 جدا شدن پیوندهای غیر اختصاصی و جذب نوری زمینه (Background) می گردد.

۲. کیفیت آب مقطر مصرفی در کیفیت محلول شستشو و جدا کردن پیوندهای غیر اختصاصی اهمیت زیادی دارد.

۳. در مواردی که مقدار TSH نمونه بیش از 25µIU/mL باشد، نمونه را با رقیق کننده نمونه(Sample diluent) موجود در کیت 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 الایزا ۲۰ تا۲۷ درجه سانتیگراد می باشد.

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

۷. بهتر است استانداردها، کنترل ها و نمونه ها را به صورت دوتایی(Duplicate) و ترجیحا در دو چاهک عمودی آزمایش کنید و میانگین جذب نوری دو چاهک جهت محاسبه نتایج مورد استفاده قرار گیرد.

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

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

۱۰. در کیت TSH 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. ۵۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار به داخل هر چاهک بریزید.
۳. ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه ، به تمام چاهک ها اضافه کنید.
٤. پلیت را بمدت ۱۵ 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(۲۷-۲۰°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 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.

- بهتر است 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. ۱۰۰ 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 ۶۳۰ نانومتر 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.

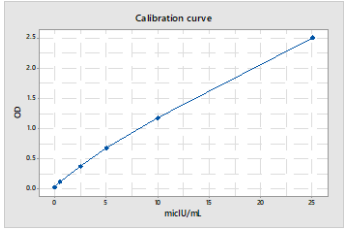
۲. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

۳. در صورتی از اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت که مجهز به سیستم داخلی پردازش داده است استفاده می کنید، جهت محاسبه نتایج و ترسیم منحنی کالیبراسیون به دستورالعمل دستگاه مراجعه نمایید. برای محاسبه نتایج کیت TSH 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 آزمایشگاه باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید براساس نتایج بدست آمده در آزمایشگاه خویش ترسیم نماید.

Row	OD	µIU/mL
1	0.025	0.0
2	0.110	0.5
3	0.370	2.5
4	0.670	5.0
5	1.170	10.0
6	2.500	25.0



کنترل کیفی:

در هر کیت دو نمونه کنترل وجود دارد که مقادیر مورد انتظار 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 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 برروی سرم تعدادی از مراجعه کنند گان ، دامنه مرجع زیر با استفاده از کیت TSH 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، عوامل جغرافیایی هر آزمایشگاه باید ابتدا انتقال پذیری(transferability) این داده ها را در خصوص جمعیت مورد نظر خویش راستی آزمایی(Verification) کرده و درصورت مشاهده نا همخوانی، بازه مرجع خود را بدست آورد.

محدوده طبیعی (µIU/mL)	0.3-5.3

یادآوری: در افراد مسن، این مقادیر افزایش می یابد.

خصوصیات اجرایی کیت

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

حد شاهد(Limit-of-Blank:LOB) و حد آشکار سازی(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 در نظر گرفته شد که ۹۵٪ از ۶۰ نتیجه اندازه گیری های تکراری مقداری کمتر از آن بدست دهد. مقدار حد شاهد معادل 0.015 µIU/mL بدست آمد. برای تعیین حد آشکار سازی ۲۰ اندازه گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم(n=۲۰×۳=۶۰) با محتوای TSH کمتر از 0.15 µIU/mL که مقدار TSH 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. از رابطه زیر حد آشکار سازی پس از گرد کردن روبه بالا معادل 0.1 µIU/mL تعیین گردید.

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

۲- دقت(Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت TSH شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس و ۲ انباشته سرمی تهیه شده از نمونه های بیمار و یک نمونه کنترل تجاری در نقاط مختلف بازه اندازه گیری(0.1-25 µIU/mL) مطابق با راهنمای EP 05-A3 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI) بدست آمد.

طی ۱۰ 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(۲×۳×۳×۱۰). نتایج به روش آماری Fully nested ANOVA تحلیل گردید: خلاصه نتایج در جدول زیر آورده شده است:

Sample Description	Mean (µIU/mL)		Repeatability		Within-Laboratory Precision
		SD	%CV	SD	%CV
Patient Pool	0.13	0.012	9.23	0.014	10.77
Patient Pool	4.02	0.33	8.08	0.35	8.73
L3-Randox	22.60	1.86	8.23	1.95	8.63

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 TSH پیشگامان سنجش ایساتیس با سایر هورمون های گلیکوپروتئینی FSH، LH 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 TSH 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 TSH اولیه بیان گردید. نتایج در جدولی که در ادامه می آید خلاصه شده است:

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

نوع ماده	غلظت	درصد تداخل(٪)
FSH	**500 mIU/ml**	**0.008**
LH	**500 mIU/ml**	**0.009**
hCG	**25000 IU/ml**	**0.001**

در کیتTSH شرکت پیشگامان سنجش هموگلوبین تا 50 mg/mL، بیلیروبین تا 20 mg/dL، و تری گلیسیرید تا 1000 mg/mL تأثیری بر سنجش ندارد(%10≤interference%).

۴- خطی بودن(Linearity):

به منظور ارزیابی خطی بودن یک نمونه با غلظت اولیه 24.5 µIU/mL را با نمونه دیگری با غلظت 0.1 µIU/mL به نسبت های مختلف با یکدیگر رقیق شد و رقت های مختلف به صورت مضاعف اندازه گیری و نتایج، با مقادیر مورد انتظار که از ضرب غلظت اولیه در ضریب رقت بدست آمده بود مقایسه گردید. میزان بازیابی و سوگرایی (اختلاف مقدار اندازه گیری شده با مقدار مورد انتظار) را در نقاط مختلف محاسبه شد که نتایج در جدول زیر خلاصه شده است:

No	Ratio	Expected (µIU/mL)	Rep 1 (µIU/mL)	Rep 2 (µIU/mL)	recovery%	%Bias
1	1	24.5	24.5	24.5	-	-
2	0.9	22.06	22.5	21.8	100.41%	0.41%
3	0.8	19.62	19.7	20.6	102.70%	2.70%
4	0.7	17.18	18.5	17.8	105.65%	5.65%
5	0.6	14.74	15.3	15.7	105.16%	5.16%
6	0.5	12.3	12.7	13.1	104.88%	4.88%
7	0.4	9.86	9.5	10.2	99.90%	-0.10%
8	0.2	4.98	5.1	4.7	98.39%	-1.61%
9	0.1	2.54	2.4	2.3	92.52%	-7.48%
10	0	0.1	0.1	0.1	-	-

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 TSH انجام گرفت.

به طور خلاصه نمونه اولیه به دو بخش مساوی تقسیم و به یکی حجمی از سرم حاوی مقدار مشخص TSH 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 (µIU/mL)	2 µIU/mL added		5 µIU/mL added		10 µIU/mL added	
		Recovery%	Bias%	Recovery%	Bias%	Recovery%	Bias%
1	0.25	109	8.00%	105	4.76%	105	4.88%
2	7.64	107	1.45%	104	1.58%	97	-1.70%
3	13.46	98	-0.26%	95	-1.35%	16	2.56%

۲-۵- ارزیابی مقایسه ای(Method comparison)

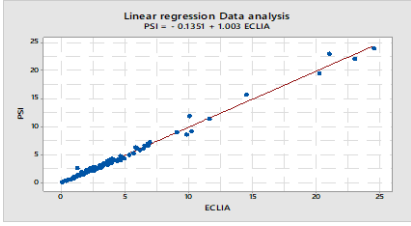
ارزیابی مقایسه ای بین نتایج اندازه گیری کیت سنجش TSH سرم شرکت پیشگامان و روش ECLIA-Cobas E411-Roche diagnostic (n=105, range:0.06-22.78 µIU/mL) انجام مطابق با راهنمای EP 09-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI) به روش

رگرسیون خطی تحلیل گردید. خلاصه نتایج و نمودار رگرسیون خطی(Linear regression) در ادامه آورده شده است:

$$PS\ ELISA = 1.003 ECLIA - 0.1351$$

$$r = 0.9952$$

$$r^2 = 0.9905$$



٦- پدیده هوک:

در این کیت پدیده هوک تا غلظت 400 µIU/mL مشاهده نگردید.

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. Kasper D.L. et al. (2015). Harrison's principles of internal medicine.19th ed. Mc Graw Hill Education.

6. McPherson R.A. et al. (2017). HENRY'S clinical diagnosis and management by laboratory Methods. 23rd ed. (pp. 373-4). Elsevier Inc.

7. Pagana K.D. et al. (2018). Mosby's Manual of diagnostic and Laboratory tests.6th ed. (pp. 435--7). Elsevier Inc.

8. Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics.6th ed. (pp. 1587-8) Elsevier Inc.

خطا یابی در آزمایش های الایزا

نوع مشکل	علت مشکل	راه حل
	افت و یا آلودگی کونژوگه	تکرار تست با کونژوگه جدید

پایین بودن OD استانداردها و نمونه ها	پایین بودن دما و یا کوتاه بودن زمان انکوباسیون، به دما نرسیدن محلولهای کیت و نمونه بیماران	دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید قبل از شروع آزمایش کیت و نمونه بیماران به دمای اتاق برسد
	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید
	طول موج خوانش نامناسب (۴۰۵nm بجای ۴۵۰ nm)	تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید طول موج دستگاه را دوباره چک کنید
صحیح نبودن نمودار استانداردها	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید
	پیپتینگ نامناسب	استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد 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	PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید 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	عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید تمام سوزن های دستگاه واشر را چک کنید
	طول موج نامناسب در خوانش	تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید طول موج دستگاه را دوباره چک کنید 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

عدم تکرار پذیری مناسب	پیپتینگ نامناسب، گرفتگی لوله داخلی سمپلر بواسطه آلودگی	استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نشود توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد 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