

IVD-REF: PS - TSH	 پیشگامان سنجش پیشگامان در مستندسازی و تست‌آوری	کیت الایزا TSH
Ver. No: 04		TSH 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 استرپتاویدین
آماده مصرف	6 × 2.0 mL	6 × 1.0 mL	6 × 0.5 mL	کالیبراتور 1-6 (0، 0/5، 2/5، 5، 10، 25 μIU/mL) در بافر، به همراه نگهدارنده با قابلیت ردیابی نسبت به ماده مرجع WHO 2nd IRP 80/558
آماده مصرف	2 × 2.0 mL	2 × 1.0 mL	2 × 0.5 mL	نمونه های کنترل در بافر سازگار با سرم انسانی همراه با نگهدارنده (بازه قابل قبول سرم کنترل بر روی پرچسب قید شده است)
آماده مصرف	1 × 2.5 mL	1 × 2.5 mL	1 × 2.5 mL	رقیق کننده نمونه (sample diluent)
آماده مصرف	1 × 12.0 mL	1 × 6.0 mL	1 × 3.0 mL	کونژوگه (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 بنزیدین 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 - TSH	 پیشگامان سنجش پخشکننده و مستعد کننده های تشخیصی و تست و آوری	کیت الایزا TSH
Ver. No: 04		TSH ELISA KIT

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) مترشح از هیپوتالاموس تحریک می شود. سطوح پایین تری و دوتیروئین (T3) و تیروکسین (T4) 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 کم کاری تیروئید ثانویه غده هیپوفیز قدامی سطوح پایینی از TSH تولید می کند، در نتیجه عدم تحریک سلول های فولیکولی تیروئید باعث کاهش سطح T3 و T4 می شود.

سنجش TSH جهت تشخیص کم کاری اولیه در نوزادان که آزمون غربالگری آنها مقادیر بسیار پایینی T4 را نشان می دهد، نیز مورد استفاده قرار می گیرد. سنجش TSH و T4 برای تشخیص افتراقی

IVD-REF: PS - TSH	 پیشگامان سنجش پیشگامان در تشخیص‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الایزا TSH
Ver. No: 04		TSH ELISA KIT

نارسایی عملکرد تیروئید و هیپوفیز مورد استفاده قرار می گیرد. کاهش T₄ همراه با TSH طبیعی یا افزایش آن بر اختلال تیروئید و کاهش T₄ 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 15 دقیقه رنگ آبی به وجود می آید. با افزودن محلول متوقف گر، واکنش آنزیمی متوقف می گردد. شدت جذب نوری در 450 نانومتر اندازه گیری می شود. شدت رنگ تولید شده با مقدار TSH موجود در سرم نسبت مستقیم دارد .

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

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

IVD-REF: PS - TSH	 پیشگام سن‌جش پیشگام در تشخیص‌های و تست‌های	کیت الیزا (TSH)
Ver. No: 04		TSH ELISA KIT

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.
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.

IVD-REF: PS - TSH	 پیشگامان سنجش پیشگامان در تشخیص‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الایزا TSH
Ver. No: 04		TSH ELISA KIT

10. استفاده از سر سمپلر یکبار مصرف برای دقت و صحت و پرهیز از آلودگی برای برداشتن نمونه‌ها استانداردها و کنترل‌ها ضروری است.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

1. سرم یا پلاسمای EDTA نمونه مناسب برای این آزمایش است.
2. از نمونه‌های با کدورت بالا، همولیز یا لیپمیک ترجیحاً استفاده نشود.
3. در صورتی که انجام آزمایش در همان روز جمع آوری نمونه امکان پذیر نباشد، نمونه‌ها را می‌توان برای مدت 48 ساعت در دمای 2 تا 8 درجه سانتیگراد نگه‌داری کرد. برای مدت طولانی‌تر نمونه‌ها باید در 20°C - سانتیگراد نگهداری شود.
4. از ذوب و انجماد مکرر نمونه‌ها اجتناب شود. نمونه‌های 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 آزمایشگاهی کاربرد دارد.
2. کلیه معرف‌های کیت برای سنجش مستقیم TSH سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده اند و برای سنجش TSH در سایر مایعات بیولوژیک یا پلاسمای غیر EDTA مناسب نمی‌باشد.
3. قبل از آغاز سنجش، دستورالعمل پیش‌رو را بدقت مطالعه نموده و اطمینان حاصل کنید که تمامی نکات آن را بخوبی فرا گرفته‌اید. همواره از ویرایش معتبر و به روز دستورالعمل که همراه کیت بسته‌بندی شده است، استفاده کنید.
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 (روش‌های صحیح میکروبی‌شناسی و تکنیک‌های صحیح آزمایشگاهی)" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست‌آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش 1393 مراجعه نمایید.

IVD-REF: PS - TSH	 پیشگامان سنجش پیشگامان در تشخیص‌های تشخیصی و تست‌های	کیت الیزا TSH
Ver. No: 04		TSH ELISA KIT

5. 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.

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 نماید.

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

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 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 1394 مراجعه نماید.

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 غیر اختصاصی و جذب نوری زمینه (Background) می گردد.

IVD-REF: PS - TSH	 پیشگامان سنجش پیشگامان در تشخیص‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الایزا TSH
Ver. No: 04		TSH ELISA KIT

2. کیفیت آب مقطر مصرفی در کیفیت محلول شستشو و جدا کردن پیوندهای غیر اختصاصی اهمیت زیادی دارد.
3. در مواردی که مقدار TSH نمونه بیش از $25\mu\text{IU/mL}$ 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.
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 ترجیحا در دو چاهک عمودی آزمایش کنید و میانگین جذب نوری دو چاهک جهت محاسبه نتایج مورد استفاده قرار گیرد.
8. جهت پپیت کردن محلول سوپسترا-رنگ زا و محلول متوقف گر از میکروپپیت های حاوی

قطعات فلزی استفاده نکنید.

9. زمان های انکوباسیون و دمای انکوباسیون را با دقت رعایت کنید.
10. 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 از 5 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 5 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.

IVD-REF: PS - TSH	 پیشگامان سنجش پیشگامان در تشخیص‌های تشخیصی و تست‌های	کیت الایزا TSH
Ver. No: 04		TSH ELISA KIT

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 می‌گردد.

13. در کلیه مراحل انجام آزمایش و متعاقب هر مرحله پیپتینگ، چاهک‌ها 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 پاسخ‌های کاذب بیانجامد.

روش انجام آزمایش:

1. تعداد چاهک‌های کوت شده برای استانداردها، کنترل‌ها و نمونه‌های بیمار را بصورت 2

تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک‌ها را همراه ماده‌نگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.

2. 50 میکرولیتر از استانداردها، کنترل‌ها و نمونه‌های بیمار به داخل هر چاهک بریزید.

3. 50 میکرولیتر از محلول کونژوگه، 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 ($27-20^{\circ}\text{C}$) 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 رطوبت، تمامی مایع موجود در چاهک‌ها را تخلیه نمایید.

IVD-REF: PS - TSH	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سیستم‌های تشخیصی و تست‌های ژنتیکی	کیت الایزا TSH
Ver. No: 04		TSH ELISA KIT

- بهتر است برای شستشو از دستگاه‌های اتوماتیک و اشر که قابل برنامه ریزی است استفاده نمایید. که در این صورت به دستورالعمل دستگاه شستشو مراجعه نمایید.
- 6. 100 میکرولیتر از سوپسترا-رنگ را آماده مصرف به تمامی چاهک‌ها اضافه کنید و آنها را بمدت 15 دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید.
- 7. 50 میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش به همان ترتیبی که محلول سوپسترا رنگ را 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 الایزا ریدر قرائت نمایید (در صورت امکان از طول موج 630 نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید).

محاسبه نتایج:

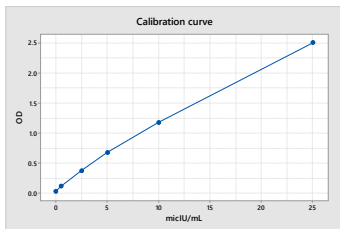
1. با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها بر روی محور عمودی (محور Y) و غلظت مشخص آنها بر روی محور افقی (محور X) بر روی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد را از طریق ترسیم خطوطی که از تمامی نقاط تلاقی عبور کرده باشد، ترسیم کنید.
2. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا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

IVD-REF: PS - TSH	 پیشگامان سنجش پیشگامان در تشخیص‌های تشخیصی و تست‌آوری	کیت الایزا TSH
Ver. No: 04		TSH ELISA KIT

داده های نمادین منحني 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	$\mu\text{IU/mL}$
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 بر روی 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 بر روی سرم تعدادی از مراجعه کنندگان (سنین 20-55 سال) چندین آزمایشگاه مختلف در سطح استان تهران ($n=240$) به عمل آمد، دامنه مرجع زیر بدون گروه بندی براساس سن و جنس مبتنی بر درون یابی دامنه بین 2/5% و 97/5% مرکزی با استفاده از کیت 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

IVD-REF: PS - TSH	 پیشگامان سنجش پیشگامان در تشخیص‌های تشخیصی و تست‌آوری	کیت الایزا TSH
Ver. No: 04		TSH ELISA KIT

پذیری (transferability) این داده‌ها را در خصوص جمعیت مورد نظر خویش راستی‌آزمایی (Verification) کرده و در صورت مشاهده ناهمخوانی، بازه مرجع خود را بدست آورد.

Age groups	2.5 th – 97.5 percentile(μ IU/mL)
Premature 28-36 wk	0.7-27
4d-<6 mo	0.7-4.8
6 mo-<14y	0.7-4.2
14 y-<19 y	0.5-3.4
19 – 55 y	0.35-5.3
Pregnancy:	
1 st trimester	0.1-2.5
2 nd trimester	0.2-3.0
3 rd trimester	0.3-3.0
55-87 y	0.5-8.9

خصوصیات اجرایی کیت

1- حد پایینی اندازه‌گیری (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 95 ام (95th percentile) از 60 بار اندازه‌گیری بر روی نمونه شاهد (استاندارد صفر) طی چندین ران بدست آمد. حد بلانک معادل غلظتی در نظر گرفته شد که 95% از 60 نتیجه اندازه‌گیری‌های تکراری مقداری کمتر از آن بدست دهد. مقدار حد شاهد معادل $0.015 \mu\text{IU/mL}$ بدست آمد. برای تعیین حد آشکار سازی 20 اندازه‌گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم ($n=20 \times 3=60$) با محتوای TSH کمتر از $0.15 \mu\text{IU/mL}$ که مقدار TSH آن به روش مستقل دیگری تعیین شده بود طی سه روز انجام شد و بزرگترین انحراف معیار اندازه‌گیری‌های 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 $0.1 \mu\text{IU/mL}$ تعیین گردید.

IVD-REF: PS - TSH	 پیشگامان سنجش پیشگامان در تشخیص‌های تشخیصی و تست‌های ژنتیکی	کیت الایزا TSH
Ver. No: 04		TSH ELISA KIT

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

2- دقت (Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت TSH شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس و 2 انباشته سرمی تهیه شده از نمونه های بیمار و یک نمونه کنترل تجاری در نقاط مختلف بازه اندازه گیری (-0.1 تا 25 μ IU/mL) 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 (2×3×3×10). نتایج به روش آماری Fully nested ANOVA تحلیل گردید: خلاصه نتایج در جدول زیر آورده شده است:

Sample Description	Mean (μ IU/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

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 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

IVD-REF: PS - TSH	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه بر مبنای تشخیص‌های نوین و تشخیص‌های نوین	کیت الایزا TSH
Ver. No: 04		TSH ELISA KIT

بالایی از همان واکنشگرها به گونه ای که ماتریکس سرم بیش از 10 درصد تغییر نکنند، تهیه شد. سپس مقدار TSH 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 TSH اولیه بیان گردید. نتایج در جدولی که در ادامه می آید خلاصه شده است:

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

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

در کیت TSH شرکت پیشگامان سنجش هموگلوبین تا 50 mg/mL، بیلیروبین تا 20 mg/dL و تری گلیسیرید تا 1000 mg/mL تأثیری بر سنجش ندارد ($\% \text{interference} \leq 10$).

IVD-REF: PS - TSH	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص‌های و تست‌های نوآوری	کیت الایزا TSH
Ver. No: 04		TSH ELISA KIT

4- خطی بودن (Linearity):

به منظور ارزیابی خطی بودن یک نمونه با غلظت اولیه $24.5 \mu\text{IU/mL}$ را با نمونه دیگری با غلظت $0.1 \mu\text{IU/mL}$ 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 ($\mu\text{IU/mL}$)	Rep 1 ($\mu\text{IU/mL}$)	Rep 2 ($\mu\text{IU/mL}$)	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	-	-

5- درستی (Trueness):

5-1- 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.

IVD-REF: PS - TSH	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص‌های و تست‌های نوآوری	کیت الایزا TSH
Ver. No: 04		TSH ELISA KIT

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 10 درصد تغییر نکند افزوده شد. و سپس بررسی توانمندی سیستم اندازه گیری در تشخیص مقدار افزوده شده از طریق رابطه زیر محاسبه گردید:

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

همچنین مقدار خطای سیستماتیک که به زبان ریاضی با بایاس بیان می گردد، از رابطه زیر بدست آمد:

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

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 %

2-5- ارزیابی مقایسه ای (Method comparison)

ارزیابی مقایسه ای بین نتایج اندازه گیری کیت سنجش TSH سرم شرکت پیشگامان و روش (n=105, range:0.06-22.78 μU/mL) ECLIA-Cobas E411-Roche diagnostic

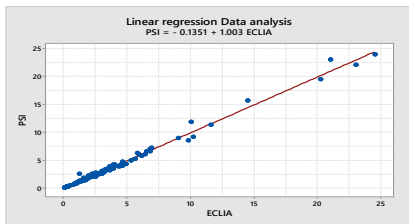
IVD-REF: PS - TSH		کیت الایزا TSH
Ver. No: 04		TSH ELISA KIT

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:

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

$$r = 0.9952$$

$$r^2 = 0.9905$$



6- پدیده هوک:

در این کیت پدیده هوک تا غلظت $400\ \mu\text{IU/mL}$ مشاهده نگردید.

IVD-REF: PS - TSH	 پیشگامان سن‌جش پژوهشگاه برای تشخیص‌های تشخیصی و تست‌های آنتی‌بادی	کیت الایزا TSH
Ver. No: 04		TSH 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. 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.

IVD-REF: PS - TSH	 پیشگامان سن‌جش پیشگامان در تشخیص‌های تشخیصی و تست‌های غربی	کیت الایزا TSH
Ver. No: 04		TSH ELISA KIT

خطایابی در آزمایش های الایزا

راه حل	علت مشکل	نوع مشکل
تکرار تست با کونزوگه جدید	افت و یا آلودگی کونزوگه	پایین بودن OD استاندارد ها و نمونه ها
دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید 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	
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	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	
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	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	
تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید طول موج دستگاه را دوباره چک کنید	طول موج خوانش نامناسب (405nm بجای 450 nm)	
از سری استاندارد جدید استفاده کنید	آلودگی استانداردها	

IVD-REF: PS - TSH	 پیشگامان سلامت پیشگامان در مستندسازی و تسهیلگری	کیت الایزا TSH
Ver. No: 04		TSH ELISA KIT

<p>استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید</p> <p>توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد</p> <p>توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود</p>	پیپتینگ نامناسب	صحیح نبودن نمودار استانداردها
<p>PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید</p> <p>پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید</p>	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	
تکرار تست با استاندارد های جدید	آلودگی استاندارد صفر	بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD
استفاده از محلول رنگزا جدید	آلودگی محلول رنگزا	
عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید	آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نامناسب	
تمام سوزن های دستگاه واش را چک کنید		
تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید	طول موج نامناسب در خوانش	
طول موج دستگاه را دوباره چک کنید از فیلتر 630 نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید		
تکرار تست با محلول Stop جدید	آلودگی محلول Stop	
تکرار تست با مواد همان کیت	استفاده از مواد سایر کیت ها	

IVD-REF: PS - TSH	 پیشگامان سنجش پیشگامان در تشخیص‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الایزا TSH
Ver. No: 04		TSH ELISA KIT

تکرار تست	انجام نشدن مرحله ای از تست	عدم تولید رنگ در چاهک ها
تکرار تست با محلول رنگزا جدید	آلودگی محلول رنگزا	
تکرار تست با محلول کونژوگه جدید	آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید	عدم تکرار پذیری مناسب
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	پیپتینگ نامناسب، گرفتگی لوله داخلی سمپلر بواسطه آلودگی	
فاصله زمانی بین اضافه کردن استاندارد ها و نمونه نباید بیشتر از 10 دقیقه باشد. در این صورت نتایج قابل اعتماد نیست	طولانی شدن زمان انجام تست	
پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	

IVD-REF: PS - TSH	 پیشگامان سن‌جش پژوهشگاه در زمینه‌های تشخیصی و تست‌و‌آزمایی	کیت الایزا TSH
Ver. No: 04		TSH ELISA KIT

پایپتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید	باقی ماندن کونژوگه در لبه چاهکها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها	
در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک‌ها نباشد	وجود حباب در چاهک‌ها	
کف چاهکها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید	کثیف بودن کف چاهکها	
قبل از استفاده، ویال محلول‌ها را به آرامی تکان دهید	مخلوط نشدن محلول‌های کیت	