MONOKIT

کیت اندازه‌گیری Anti-TPO در سرم انسان
Anti-TPO ELISA Kit 96t
Cat. No: 5434-96 / Rev: A2 (1402/09/25)

مقدمه:

اتوآنتی‌بادی بر علیه آنزیم تیروئید پروکسیداز (TPO) در ۹۵ درصد بیماران مبتلا به بیماری تیروئیدیت هاشیموتو یافت می‌شوند و حدود ۷۲ درصد از افراد Anti-TPO مثبت درجات مختلفی از اختلالات تیروئیدی را بروز می‌دهند. بر این اساس، تست Anti-TPO جهت تشخیص افتراقی اولیه بیماری‌های تیروئید نظیر بیماری گریوز، تیروئیدیت هاشیموتو، گواتر غیرسمی و تیروئیدیت مزمن لنفوسیتیک (در اطفال) انجام می‌شود. سنجش Anti-TPO اغلب به‌همراه اندازه‌گیری سطح آنتی‌تیروگلوبولین انجام می‌شود. حیطه کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی Anti-TPO در سرم یا پلاسمای انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این آزمایش بر اساس الایزای ترتیبی طراحی شده است. در این روش، ابتدا نمونه یا کالیبراتور حاوی اتوآنتی‌بادی ضد TPO به‌همراه آنتی‌ژن TPO بیوتینیله در چاهک‌های حاوی **استرپتاویدین** تثبیت شده انکوبه می‌شوند. پس از شستشو و حذف ترکیبات متصل نشده، آنتی‌بادی ضد IgG انسان (کونژوگه شده با آنزیم HRP) اضافه می‌شود. با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که بیشترین جذب نوری را در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر دارد. شدت جذب نوری هر چاهک با غلظت Anti-TPO موجود در نمونه ارتباط مستقیم دارد. در نهایت میزان Anti-TPO در نمونه‌ها به کمک منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
۲) کالیبراتور (Anti-TPO Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ IU/mL تهیه شده از سرم انسانی.
۳) محلول کونژوگه آنزیمی (Anti-TPO Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP در بافر.
۴) محلول کونژوگه بیوتینی (Anti-TPO Biotin Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌ژن متصل به بیوتین در بافر.
۵) بافر رقیق‌کننده نمونه (Sample Diluent-10X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
۶) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
۷) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۸) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۹) محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۱۰) محلول کنترل (Anti-TPO Control): ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری.
۱۱) برچسب مخصوص پلیت.

توجه ۱: تمام محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.
توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در برگه COA درج شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

۱) دستگاه خوانش‌گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
۲) سمپلر کالیبره.
۳) آب مقطر دیونیزه.

احتیاط در استفاده از کیت:

۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری کنید.
۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نشود.
۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBs Ag، HIV1/2 و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شود.
۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جلوگیری نمایید.
۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

۱) نمونه‌های مناسب برای این آزمایش سرم یا پلاسما (حاوی هپارین یا EDTA) می‌باشد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا گردد. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نشود.
۲) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا یک ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری نمایید.
۳) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین (>5 mg/day) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.
۴) **رقیق‌سازی نمونه**: حجم ۱۰ میکرولیتر از نمونه بیمار را به ۱ میلی‌لیتر بافر رقیق‌کننده نمونه آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف ها را مطالعه بفرمایید) اضافه کرده و محتویات را با سر و ته کردن کاملاً یکنواخت نمایید. نمونه رقیق شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری است.

آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:

۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری نمایید.
۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیترمحلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.
۳) آماده‌سازی بافر رقیق‌کننده نمونه: مقدار مورد نیاز از محلول رقیق‌کننده نمونه (10X) را به نسبت ۱:۹ با آب مقطر دیونیزه رقیق کنید. به‌عنوان مثال، برای تهیه یک میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده نمونه (10X) را به ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه اضافه کنید.

توجه: کالیبراتورها و کنترل‌های کیت آماده مصرف هستند و نیازی به رقیق‌سازی ندارند.

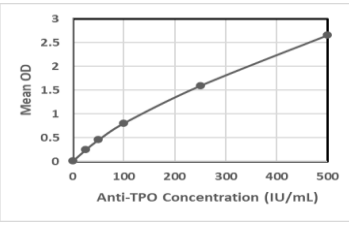
روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.
۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک‌ها را به‌همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.
۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌های رقیق شده و کنترل در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.
۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه بیوتینی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید.
۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
۵) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت یا آسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت[1] اقدام نمایید.
۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری نمایید.
۷) پلیت را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
۸) شستشوی چاهک‌ها را مطابق با بند ۵ تکرار نمایید.
۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزای آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.
۱۰) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.
۱۱) شدت جذب نوری هر چاهک را در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از روش Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش اندازه گیری نمایید (از طول‌موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر ارائه شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (IU/mL)
Cal. A	A1	0.013	0.017	0
	B1	0.022		
Cal. B	C1	0.247	0.252	25
	D1	0.258		
Cal. C	E1	0.418	0.406	50
	F1	0.395		
Cal. D	G1	0.810	0.811	100
	H1	0.813		
Cal. E	A2	1.612	1.596	250
	B2	1.580		
Cal. F	C2	2.720	2.658	500
	D2	2.597		

1. http://www.samantajhiz.com/Support

ISO13485 KGS



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای Anti-TPO

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به‌قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر برای آنالیت مورد نظر باید توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

Normal Range
< 40 (IU/mL)
1 IU/mL = 1 KU/L

پارامترهای کنترل کیفی

۱) بررسی دقت-آزمون دقت درون‌دور (Within Run)

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت و دو سطح کنترل در یک نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

Sample/ Control	1	2	3	Ctrl. 1	Ctrl. 2
No. of Repeats	20	20	20	20	20
Mean (IU/mL)	5.1	23.7	91.3	12.4	24.6
SD (IU/mL)	0.3	1.2	4.1	0.6	1
CV (%)	5.9	5.1	4.5	4.8	4.1

۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین‌دور (Between Run)

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت و دو سطح کنترل در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10%است.

Sample/ Control	1	2	3	Ctrl. 1	Ctrl. 2
No. of Repeats	20	20	20	20	20
Mean (IU/mL)	8.1	22.8	116.2	12.2	24.1
SD (IU/mL)	0.5	1.3	5.4	0.5	1.1
CV (%)	6.2	5.7	4.6	4.1	4.6

۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و سطح Anti-TPO در ترکیب به‌دست آمده اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش، Bias<36.9% نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (IU/mL)	Added (IU/mL)	Exp. (IU/mL)	Obs. (IU/mL)	% Rec.
1	12.3	153.2	82.7	85.2	103
2	153.2	47.5	100.3	104.4	104.1
3	321.5	298.6	310	307.6	99.2

۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست، غلظت Anti-TPO در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش Bias<36.9% است.

No.	Sample (IU/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
		% Bias				
1	9.3	1.1	-2.3	-2.8	-3	-3.3
2	45.2	0.6	1.9	-2.3	-2.7	-3
3	304.6	1.3	-1.5	-2.2	2.8	-3.1

۵) بررسی درستی - مقایسه روش‌ها (Comparison of Methods)

جهت بررسی درستی نتایج این کیت، میزان Anti-TPO در ۱۰۰ نمونه سرم با مقادیر پایین و بالا اندازه‌گیری شد و نتایج آن با کیت مرجع مقایسه و ضریب همبستگی بین نتایج به‌دست‌آمده از دو کیت، بر اساس روش پیرسون، ۰/۹۹۶ محاسبه گردید. معیار پذیرش برای این آزمایش به صورت زیر تعریف شده است:

$$0.9 \leq \text{Pearson Correlation Coefficient} \leq 1.0$$

۶) بررسی تداخلات (Interference)

بر اساس فرمول زیر درصد تداخل ترکیبات رایج موجود در نمونه‌ها در سنجش Anti-TPO مورد ارزیابی قرار گرفت:

$$\text{درصد تداخل} = \frac{\text{میانگین غلظت قبل از افزودن آنالیت مداخله گر - میانگین غلظت بعد از افزودن آنالیت مداخله گر}}{\text{غلظت آنالیت مداخله‌گر}} \times ۱۰۰$$

براساس نتایج به‌دست‌آمده هموگلوبین تا ۷۰۰، بیلی‌روبین تا ۲۰ و تری‌گلیسرید تا ۲۵۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر تأثیری بر نتیجه سنجش ندارند؛ ولی به‌طور عمومی توصیه می‌شود که از نمونه‌های لیپمیک برای تست الایزا استفاده نشود.

۷) بررسی ویژگی-آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)

ویژگی کیت Anti-TPO با اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از آنتی‌بادی‌های ضد ANA، DNA، تیروگلوبولین و فاکتور روماتوئید، به نمونه سرم بررسی شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری نسبت مقدار ماده اضافه شده به مقدار Anti-TPO مورد نیاز برای ایجاد همان مقدارجذب، نشان‌دهنده عدم واکنش متقاطع آنتی‌بادی‌های مذکور بود. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده ۱۰۰±۱۰ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

۸) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با ۰/۹۵ IU/mL تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645\ SD_s$$
$$LOB = Mean_b + 1.645\ SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

۹) بررسی پایداری(Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۳ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۱۸ ماه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی نتایج به‌صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص‌شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

علائم استفاده شده در برچسب کالاها

	Manufacturer
	Use-by date
LOT	Batch code
IVD	In vitro diagnostic medical device
OBL	Own brand Labeling
Σ	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

1. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013 Nov 8.

2. Kaczur V, Vereb G, Molnar I, Krajczar G, Kiss E, Farid NR, Balazs C. Effect of anti-thyroid peroxidase (TPO) antibodies on TPO activity measured by chemiluminescence assay. Clinical chemistry. 1997 Aug 1; 43(8):1392-6.

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

www.samantajhiz.com

تهران- بزرگراه آبشناسان- سردارجنگل شمالی- خیابان پنج تن- بلوار قدس- کوچه دوم شرقی- پلاک ۸

تلفن: ۰۲۱۸۵۵۱۸۰۰۰