

مقدمه:

اتوانتوبادی 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 اتوانتوبادی ضد TPO به‌همراه آنتی‌ژن TPO بیوتینیل 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 طول موج 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 (نمودار کالیبراتورها) 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): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
 - ۸) محلول رنگزا B (Substrate Solution): 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: کلیه 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 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 نکنید.
- 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 مخاط‌ها جلوگیری کنید.
- 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 شود. حتی الامکان از نمونه‌های اکتتریک، لیمپیک و همولیز استفاده نکنید.
- ۲) درب 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 کنید.
- ۳) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین ($> 5 \text{ mg/day}$) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.

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 کنید.
- ۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول 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) تهیه 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 رقیق‌کننده نمونه (10X) را به ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه اضافه کنید.
- ۴) رقیق‌سازی نمونه: حجم ۱۰ میکرولیتر از نمونه بیمار را به ۱ میلی‌لیتر بافر رقیق‌کننده نمونه (آماده مصرف) اضافه کرده و محتویات را با سر و ته کردن کاملاً یکپوخت نمایید. نمونه رقیق شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲-۸ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری است.

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

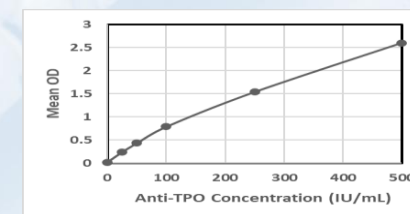
روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای

- ۱) اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکپوخت 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.
- توجه: چاهک اول به‌عنوان بلانک در نظر گرفته شود. در این چاهک نمونه و یا کالیبراتور ریخته نشود. بقیه مراحل با سایر چاهک‌ها یکسان می‌باشد.
- 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 ببوشانید 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 ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) 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 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 فرمایید) 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 طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از روش Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش اندازه‌گیری نمایید (از طول‌موج فرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر

استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر ارائه شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (IU/mL)
Cal. A	A1	0.021	0.025	0
	B1	0.029		
Cal. B	C1	0.250	0.245	25
	D1	0.240		
Cal. C	E1	0.460	0.435	50
	F1	0.410		
Cal. D	G1	0.810	0.790	100
	H1	0.770		
Cal. E	A2	1.510	1.540	250
	B2	1.570		
Cal. F	C2	2.700	2.600	500
	D2	2.500		



مقادیر مورد انتظار برای تست ایزای Anti-TPO

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

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

پارامترهای کنترل کیفی

۱) بررسی دقت-آزمون دقت درون دور (Within Run)

دقت درون دور با ارزیابی تکراری پذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت های متفاوت و دو سطح کنترل در یک نوبت کاری (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)	5.6	25.9	108.3	12.7	24.5
SD (IU/mL)	0.3	1.3	4.4	0.6	1.1
CV (%)	5.4	5.0	4.1	4.7	4.5

۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین دور (Between Run)

دقت بین دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت های متفاوت و دو سطح کنترل در ۴ نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت کاری) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Sample/Control	1	2	3	Cont. 1	Cont. 2
No. of Repeats	20	20	20	20	20
Mean (IU/mL)	10.1	52.2	179.0	12.6	24.7
SD (IU/mL)	0.6	2.7	8.1	0.6	1.1
CV (%)	5.9	5.2	4.5	4.8	4.4

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 به دست آمده اندازه گیری 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	16.9	180.2	98.6	95.8	97.2
2	180.2	345.2	262.7	270.4	102.9
3	346.2	16.9	181.6	188.2	103.6

۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست، غلظت Anti-TPO در رقت های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه گیری 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	39.9	2.3	-0.8	-1.2	-2	-1.5
2	234.1	-2.5	2.2	-0.8	-1.7	-2.6
3	388.2	1.5	-1.7	-2.7	2.9	-2.1

۵) بررسی درستی-مقایسه روش ها (Comparison of Methods)

جهت بررسی درستی نتایج این کیت، میزان Anti-TPO در ۱۰۰ نمونه سرم با مقادیر نرمال و بالا اندازه گیری شد و نتایج آن با کیت مرجع مقایسه و ضریب همبستگی بین نتایج به دست آمده از دو کیت، بر اساس روش پیرسون، ۰/۹۹۸ 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 نمونه ها در سنجش Anti-TPO مورد ارزیابی قرار گرفت:

$$\% \text{ تداخل} = \frac{\text{میانگین غلظت قبل از افزودن آنالیت مداخله گر} - \text{میانگین غلظت بعد از افزودن آنالیت مداخله گر}}{\text{غلظت آنالیت مداخله گر}} \times 100 = \text{درصد تداخل}$$

بر اساس نتایج به دست آمده هموگلوبین تا ۷۰۰، بیلی روبین تا ۲۰ و تری گلیسرید تا ۲۵۰ میلی گرم بر دسی لیتر تأثیری بر نتیجه سنجش ندارند؛ ولی به طور عمومی توصیه می شود که از نمونه های لیپمیک برای تست ایزای استفاده نشود.

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

ویژگی کیت Anti-TPO با اضافه کردن غلظت های مختلفی از آنتی بادی های ضد ANA، DNA، تیروگلوبولین و فاکتور روماتوئید، به نمونه سرم بررسی شد. نتایج حاصل از اندازه گیری نسبت مقدار ماده اضافه شده به مقدار Anti-TPO مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، نشان دهنده عدم واکنش متقاطع آنتی بادی های مذکور بود. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده $10 \pm 10\%$ 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.

$$\begin{aligned} \text{LOD} &= \text{LOB} + 1.645 \text{ SD}_b \\ \text{LOB} &= \text{Mean}_b + 1.645 \text{ SD}_b \end{aligned}$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

۹) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی گراد.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی گراد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار. نتایج به دست آمده نشان می دهد که کیت مورد نظر در زمان های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش های مربوط به تعیین پایداری، تغییر کمتر از ۲۰ درصد در OD کالیبراتورها است.

علامت استفاده شده در پرچسب کالاها

EC REP	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
LOT	Batch code
IVD	In vitro diagnostic medical device
CE	European conformity
REF	Catalogue number
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

- Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013 Nov 8.
- 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 شماره های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.