

آرامی به موضع خونگیری وارد نمایید تا خون بدون انعقاد جاری شود. قطره اول را با گاز استریل و تمیزی پاک کرده سپس با فشارهای متناوب و مختصر که به پاشنه پا وارد میشود، قطره بزرگی شکل می گیرد.

۴ - کاغذ صافی را به قطره خون نزدیک کرده و آن را به مرکز دایره بچکانید. حجم قطره خون باید به اندازه ای باشد که پشت و روی دایره را بپوشاند و آن را اشباع کند. معمولاً با تکنیک صحیح میتوان چهار یا پنج دایره را روی کاغذ صافی به ترتیب فوق پر نمود. (توجه داشته باشید که سطح خون آلود کارت بهیچوجه با دست و حتی دستکش لمس نشود و همچنین مراقب باشید که هنگام خونگیری هیچگونه خراشی یا پارگی روی کاغذ بوجود نیاید)

۵ - کارت خون را بصورت افقی روی پایه مسطح قرار دهید ، بطوریکه لکه خون با جایی تماس پیدا نکند. حداقل ۳ ساعت وقت لازم است تا این کاغذ در دمای ۱۵ تا ۲۵ محیط کاملاً خشک شود. در این مدت باید از قراردادن کارتهای خونی در جریان هوای آلوده به دود و گرد و غبار و همچنین از گذاشتن در معرض حرارت و تابش مستقیم نور خورشید جداً خودداری شود.

۶ - هر یک از نمونه ها را جداگانه و همراه فرم مشخصات نوزاد ، در پاکتی قرار دهید. احتیاط کنید کارتهای خونی با هم در تماس نباشند بدین ترتیب جابجائی و حمل و نقل نمونه های خون بدون آسیب دیدگی انجام میگردد.

۷ - کارتهای خون را میتوان در پاکتهای غیر قابل نفوذ به رطوبت در یخچال تا دو ماه و در فریزر ۲۰- بمدت طولانی نگهداری نمود. نمونه های کنترل و استاندارد نیز باید در پاکتهای آلومینیومی مخصوص خود که در داخل کیت قرار داده شده نگهداری شوند تا کیفیت آنها در دراز مدت حفظ گردد .

مواد و وسایل داخل کیت :

یک عدد	۱- میکروپلیت ۹۶ حفره ای ، پوشیده شده با آنتی بادی ضد TSH
یک ویال	۲- معرف شماره (۱) ، تامپون استخراج (Extraction Buffer)
یک ویال	۳- معرف شماره (۲) ، تامپون شستشو (Washing Buffer - 10x) (با آب مقطر به حجم ۵۰۰ میلی لیتر رسانده شود.)
یک ویال	۴- معرف شماره (۳) ، آنتی بادی کونژوگه (Conjugated Antibody Solution)
یک ویال	۵- معرف شماره (۴) ، محلول رنگزا (Chromogen Solution)
یک ویال	۶- معرف شماره (۵) ، محلول متوقف کننده (Stop Solution)
یک عدد	۷- نوار های کاغذ صافی با لکه های خونی استاندارد حاوی شش غلظت مختلف خشک شده بر کاغذ صافی مخصوص (Schleicher & Schuell NO 903) S&S 903 (0 , 4 , 10 , 27 , 52 , 65 $\mu\text{IU} / \text{ml}$, Whole Blood)
یک عدد	۸- نوار های کاغذ صافی با لکه های خونی جهت کنترل (لکه کنترل) در دو غلظت در محدوده غلظت نرمال و آنرمال ، خشک شده بر کاغذ صافی مخصوص (Schleicher & Schuell S&S 903) # مقادیر ارزشی کنترل ها بر روی لکه کنترل درج گردیده است. # نوار های کاغذ صافی تا پایان زمان انقضای کیت در یخچال ۴ تا ۸ درجه و بمدت طولانی تر در فریزر ۲۰- درجه پایدار خواهد بود.
یک عدد	۹- برچسب مخصوص پلیت

Neonatal TSH

اندازه گیری TSH در خون نوزادان

مقدمه :

کیت TSH-NEO اختصاصاً بمنظور اندازه گیری غلظت TSH در خون نوزادان که بر روی کاغذ صافی مخصوص (کارت گاتری) جمع آوری و خشک میشود ، تهیه شده است. استفاده از خون خشک شده بر کاغذ صافی تاریخچه ایی ۴۰ ساله دارد. این روش اولین بار توسط رابرت گاتری به منظور غربالگری نوزادان از نظر فنیل آلانین خون بکار گرفته شد. امروزه با توسعه روزافزون مصرف خون خشک شده ، این تکنیک بنام مبتکر آن " کارت گاتری " نامگذاری شده است. چون تعیین غلظت TSH در تفکیک اطفال هیپوتیروئیدی از اطفال سالم مفیدتر از T4 است (۱) ، لذا شرکت کیمیاپژوهان به تهیه کیت TSH-NEO ارجحیت قائل شده است. این کیت غلظت TSH را بروش ایمونوآنزیماتیک (ELISA) و روی یک دیسک کوچک ۳ میلی متری خون در کارت گاتری اندازه گیری میکند.

ارزش بالینی :

هیپوتیروئیدی مادرزادی (Congenital Hypothyroidism) بیماری خطرناکی است که در صورت عدم تشخیص و درمان بموقع ، منجر به کندی رشد طبیعی کودک و عقب ماندگی شدید ذهنی او میگردد. چون تشخیص این بیماری در مراحل اولیه مشکل و تقریباً غیر ممکن است ، بهمین دلیل مجامع پزشکی جهان غربالگری همه نوزادان را در بدو تولد توصیه میکنند (۲) .

اصول آزمایش :

در این روش TSH خون نوزاد بر اساس روش ایمونوآنزیماتیک (ELISA) و بکمک دو آنتی بادی مونوکلونال یکی ساده و دیگری با مارکر پراکسیداز تعیین مقدار میشود. روش ایمونوآنزیماتیک کاملاً اختصاصی عمل کرده و از حساسیت قابل توجهی برخوردار است.

تهیه و نگهداری نمونه :

اندازه گیری TSH روی لکه خونی که از پاشنه پای نوزاد تهیه و بر کاغذ صافی مخصوص " کارت گاتری " S&S 903 (Schleicher & Schuell NO 903) خشک می شود انجام میگردد. خون گیری معمولاً طی ۲۴ تا ۷۲ ساعت بعد از تولد بر اساس روش استاندارد که توسط کمیته ملی استاندارد آزمایشگاههای بالینی (NCCLS) ارائه شده است به ترتیب زیر انجام میگردد.
۱ - پاشنه پا را با یک دستمال یا حوله ولرم (حرارت ۴۰ تا ۴۵ درجه) گرم کرده تا جریان خون در محل افزایش یابد.
۲ - قبلاً محل ضربه " لانست " و اطراف آن را با ایزوپروپانول ۷۰ درصد کاملاً تمیز نموده و صبر کنید تا در جریان هوا کاملاً خشک شود.

۳ - با استفاده از دستکش استریل یکبار مصرف ، و بکمک یک " لانست " که طول سوزن آن از ۲/۴ میلیمتر تجاوز نکند ، ضربه یکنواخت و

وسایل مورد نیاز :

- ۱ - میکروپلیت ریدر با فیلتر ۴۵۰ نانومتر و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر
- ۲ - شیکر الایزا
- ۳ - سمپلر ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتری و نوک سمپلر زرد و آبی یکبار مصرف
- ۴ - کاغذ سوراخ کن (پانچر) ۳ میلی متر (این وسیله با تیغه برش مقاوم در شرکت موجود و قابل خریداری میباشد).
- ۵ - کاغذ یا پارچه جاذب آب

روش کار :

- پیش از شروع کار صبر نموده تا معرفها و پلیت به دمای محیط برسند.

- **آماده سازی تامپون شستشو:** محتوای ویال تامپون شستشو را با آب مقطر به حجم ۵۰۰ برسانید.

۱ - قبل از هر کار مراقب باشید سطح زیر پلیت خراش برنداشته و یا اثر انگشت بر آن باقی نماند.

۲ - تعداد لازم از استریپ های میکروپلیت را برای آزمایش جدا کرده و بقیه را بلافاصله در زیپ کیپ قرار داده و پس از مسدود کردن کامل آن بداخل یخچال برگردانید.

۳ - یک دیسک خونی به قطر ۳ میلی متر از نمونه های بیمار و استاندارد ها ، به درون حفره های میکروپلیت بیندازید (نمونه های بیمار و استاندارد را دوبله آزمایش کنید) و ۱۰۰ میکرولیتر تامپون استخراج کننده (معرف شماره ۱) به آنها بیفزایید بطوریکه روی دیسکها را کاملاً بپوشاند. مراقب باشید که حباب هوا وارد حفره ها نشود و نوک سرسمپلر به کف آن ها برخورد نکند .

۴ - میکروپلیت حاوی لکه های خونی را با آرامی و به مدت ۳۰ ثانیه تکان دهید روی پلیت را با روکش پلاستیکی پوشانده و **بمدت ۲ ساعت**

بر روی شیکر ($\leq 60 \text{ rpm}$) در دمای اتاق و یا بیش از ۱۵

ساعت در دمای ۴ درجه یخچال انکوبه نمایید.

۵ - با حرکت سریع و یکنواخت ، دیسکهای خونی را همراه با تامپون در تشتی حاوی محلول هیپوکلریت خالی کنید.

۶ - شستشو میکروپلیت به یکی از دو روش زیر انجام میشود

الف) شستشوی دستی : هر چاهک از میکروپلیت را یکمک

سمپلر از محلول شستشو (1X) کاملاً پر نمایید و سپس محتویات چاهک را با وارونه کردن در ظرف مخصوص تخلیه نمایید. این کار را ۵ بار انجام داده و در انتها پس از تخلیه محتویات چاهک ها ، قطرات باقیمانده محلول شستشو در میکروپلیت را ، با زدن آن بصورت وارونه بر روی دستمال یا کاغذ جاذب رطوبت کاملاً تخلیه نمایید.

ب) شستشوی اتوماتیک : محتویات چاهک ها را کاملاً

آسپیره کرده و سپس ۵ مرتبه با حجم ۴۰۰ - ۳۵۰ میکرولیتر از محلول شستشو (1X) بشوئید. و در آخر پس از تخلیه محتویات چاهک ها ، قطرات باقیمانده محلول شستشو در میکروپلیت را با زدن آن بصورت وارونه بر روی دستمال یا کاغذ جاذب رطوبت کاملاً تخلیه نمایید

۷- **بدرون هر یک از حفره ها ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی کونژوگه**

بریزید. روی پلیت را با روکش پلاستیکی پوشانده و بمدت یک

ساعت در دمای اتاق قرار دهید.

۸- محتویات میکروپلیت را تخلیه کرده و عمل شستشو را مانند مرحله ۶ تکرار نمایید.

۹- از محلول رنگزا (معرف شماره ۴) ۱۰۰ میکرولیتر بداخل حفره ها بریزید .

۱۰- پلیت را بمدت ۱۵ دقیقه در حرارت اتاق و محیط تاریک قرار دهید و سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (معرف شماره ۵) به هر حفره اضافه کرده و با آرامی تکان دهید تا مخلوط شود .

* به منظور حفظ یکزمانی فعل و انفعال در تمام حفره ها ، ترتیب افزودن محلول متوقف کننده را مانند مرحله ۹ انجام دهید.

۱۱- جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر و حداکثر در فاصله زمانی ۱۵ دقیقه اندازه گیری کنید. (توصیه می شود از فیلتر ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر فرانس استفاده گردد)

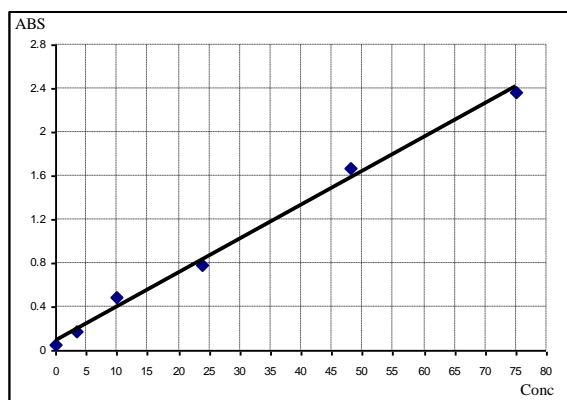
محاسبه :

۱ - میانگین جذب نوری (OD) نمونه ها و استانداردها را به کمک دستگاه ریدر الایزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان در مقابل فیلتر فرانس ۶۳۰ نانومتر) بخوانید

۲ - منحنی استاندارد را بر روی کاغذ شطرنجی و بر اساس غلظت استانداردها ($\mu\text{IU} / \text{ml}$, Whole Blood) و جذب نوری آنها (OD) رسم نمایید.

۳ - غلظت نمونه های مجهول را از روی منحنی استاندارد بدست آورید. **توجه :** جذبهای نوری و منحنی مربوطه فقط بعنوان نمونه میباشد و هر آزمایشگاهی در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

Standard ($\mu\text{IU}/\text{ML}, \text{WB}$)	ABS 450	Mean
0	0.047 0.054	0.050
4.5	0.215 0.205	0.210
10	0.531 0.519	0.525
30	1.079 1.051	1.065
65	1.880 1.860	1.870
85	2.552 2.638	2.595



TSH concentration ($\mu\text{IU}/\text{ML}$, Whole Blood)

مشخصات کیفی :

۸- صحت :

صحت با استفاده از نمونه های کنترل کیفی شرکت DGKL ارزیابی گردید.

Sample NO.	DGKL Value (mIU/L,whole blood)	Kimiapajouhan value (mIU/L,whole blood)
TS1/08		
9999751-1	10.5 (6.30 14.7)	10.3
9999751-2	4.70 (2.30 7.10)	3.4
9999751-3	26.2 (15.7 36.7)	29.2
9999751-4	17 (10.2 23.8)	15.8

محدوده طبیعی :

TSH خون در ۵۰۰ نوزاد ۲ تا ۴ روزه مورد آزمایش قرار گرفت در نزدیک به 87% نوزادان، غلظت TSH بین $0 - 2 \mu\text{IU} / \text{ml}$, Whole Blood و در 97.5% نوزادان تا حداکثر $10 \mu\text{IU} / \text{ml}$, Whole Blood (cut-off) بدست آمد توصیه میگردد هر آزمایشگاه غربالگری نوزادان محدوده cut-off خود را معین و نمونه های نزدیک به آن را (نمونه های مشکوک) آزمایش مجدد نماید.

Cut Off : 0 - 10 $\mu\text{IU} / \text{ml}$, Whole Blood

نکات قابل توجه در روش کار :

- ۱ - برای هر سری آزمایش لازم است که منحنی استاندارد جدیدی رسم شود.
- ۲ - برای حصول اطمینان از نتیجه آزمایش، نمونه های مشکوک مجدداً آزمایش شوند.
- ۳ - معرفهای درون کیت را با کیت های مشابه حتی با یک سری ساخت، تعویض نکنید.
- ۴ - نمونه های خون از نظر بهداشتی و عفونت زائی باید با احتیاط به کار گرفته شوند و شرایط لازم دقیقاً رعایت گردد.
- ۵ - محتوی پلیت حاوی دیسکهای خونی، در ظرف حاوی ماده ضدعفونی کننده (مانند هیپوکلریت سدیم) دفع شود.
- ۶ - معرف رنگی با دست و چشم برخورد نکند.
- ۷ - برای کسب اطمینان از کیفیت آزمایش، باید دقت و صحت سمپلرها و میکروپلیت ریدر مرتباً کنترل شود.
- ۸ - از خراش برداشتن کف پلیت ها و اثر انگشت بر آنها جداً خودداری شود.

Reference:

- 1-Caldwell G.Gow SM,et al . Lancet (1985) 1;1117
- 2- Ross DS, Daniel GH,Gouveia D J Clin Endocrinol Metab (1990) 71;764.
- 3- Feldkamp CS,Carey JL.Am J Clin Pathol (1996) 105;11.
- 4- Spencan CA,et al. J Clin Endocrinol Metab (1993) 76;494

TSH – NEO / 2009

۱ - دقت (Intra-assay) : در سه غلظت مختلف مورد آزمایش

قرار گرفت

Sample	1	2	3	4
n	12	12	12	12
Mean (mIU/L whole blood)	5.1	8.6	17.9	30
Standard Deviation	0.6	0.7	1.3	2.0
% CV	11.6	8.0	7.4	6.6

۲ - دقت (Inter-assay) : در سه غلظت مختلف مورد آزمایش

قرار گرفت

Sample	1	2	3	4
n	12	12	12	12
Mean (mIU/L whole blood)	4.7	8.8	18.6	31.7
Standard Deviation	0.6	0.9	1.3	2.3
% CV	13.2	9.8	7.2	7.3

۳ - ریکواری : تست با پنج 5 mm نمونه ها انجام گردید و از پنج

3 mm برای بررسی ریکواری استفاده گردید

Added ($\mu\text{IU}/\text{ml}$,whole blood)	measured ($\mu\text{IU}/\text{ml}$,whole blood)	Recovery %
13.334	14.5	108.7
40	43.2	108.0
66.667	71	106.5

۴ - حساسیت : حداقل مقدار قابل سنجش با اندازه گیری جذب

نوری غلظت صفر (۱۲ مرتبه) و افزودن 2SD به میانگین آن و محاسبه غلظت از روی منحنی استاندارد بدست آمد

Minimum detectable : 1.2 $\mu\text{IU}/\text{ml}$,whole blood

۵ - اختصاصیت : اختصاصیت آزمایش با افزودن غلظت های مختلف

hFSH , hLH و HCG به نمونه های خون ارزیابی گردید.

تداخل غلظت	غلظت	آتالیبت
< 0.1	1000	hFSH (IU/L)
< 0.1	100	
< 0.1	10	
< 0.1	1000	hLH(mIU/L)
< 0.1	100	
< 0.1	10	
< 0.1	100000	HCG(IU/L)
< 0.1	10000	
< 0.1	1000	

۶- کالیبراسیون :

استاندارد داخل کیت در مقابل استاندارد WHO 2nd I.R.P of Htsh

80/558 کالیبر گردید.

۷- اثر هوک (Hook Effect) : آزمایش TSH با نمونه های لکه

خون تا غلظت بسیار زیاد (12000 mIU/L,whole blood) صورت گرفته و پدیده هوک مشاهده نشد.