

کیت اندازه‌گیری هورمون TSH در سرم انسان

**TSH ELISA Kit**

96 Tests: Cat. No: 0524-96

192 Tests: Cat. No: 2024-192

Rev: B4 (1404/09/08)

**مقدمه:**

TSH هورمونی گلیکوپروتئینی است که توسط سلول‌های تیروتروپ هیپوفیز قدامی ساخته و ترشح می‌شود و مسئول تنظیم ترشح هورمون‌های تیروکسین و تری‌یودوترونین توسط غده تیروئید است. تنظیم ترشح هورمون TSH از طریق هورمون آزادکننده تیروتروپین (TRH) صورت می‌پذیرد. TRH در هیپوتالاموس ساخته و به هیپوفیز قدامی منتقل می‌شود و باعث افزایش ترشح TSH می‌گردد. مقادیر هورمون‌های T3 و T4 در خون بر میزان ترشح هورمون TSH اثر دارند؛ به طوری که ترشح TSH توسط مقادیر T3 و T4 آزاد موجود در خون به صورت فیدبک منفی تنظیم می‌گردد. زنجیره آلفا در ساختار TSH و دیگر هورمون‌های گلیکوپروتئینی نظیر LH، FSH و hCG یکسان است؛ اما زنجیره بتا در هر پروتئین منحصر به فرد و مسئول فعالیت بیولوژیک و شاخص آنتی‌ژنیک آن هورمون می‌باشد. TSH یکی از مارکر تشخیص هاپیپرتیروئیدیسم یا هایپوتیروئیدیسم است. حیطة کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی غلظت TSH در سرم انسان به روش الایزا است.

**اصول آزمایش:**

این تست بر اساس الایزای ساندویچ طراحی شده است. در این روش بی‌حرکت‌سازی کمپلکس ایمنی توسط واکنش بین **استرپتاویدین** تثبیت شده در سطح چاهک و آنتی‌بادی مونوکلونال بیوتینیله ضد TSH صورت می‌گیرد. با مخلوط شدن آنتی‌بادی بیوتینیله، آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP و سرم حاوی آنتی‌ژن، واکنش بین آنتی‌بادی‌ها و آنتی‌ژن بدون هیچ رقابتی صورت می‌گیرد و کمپلکس ساندویچ محلول ایجاد می‌گردد. به موازات واکنش فوق، کمپلکس ایمنی به دلیل تمایل بسیار بالای بین استرپتاویدین و بیوتین، به سطح چاهک متصل می‌شود. پس از شستشوی چاهک‌ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. میزان رنگ ایجاد شده و در نتیجه

شدت جذب نوری، با غلظت TSH سرم ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت TSH سرم به کمک منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

**محتویات کیت:**

محتویات کیت	۹۶ تستی	۱۹۲ تستی
میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده	یک عدد	دو عدد
کالیبراتورها (TSH Cal A-F) : شش ویال با غلظت‌های ۰.۰۰، ۰.۲۵، ۰.۵، ۱.۰ و ۲.۵ μIU/mL	یک سری ویال با غلظت-های متفاوت	یک سری ویال با غلظت‌های متفاوت
محلول کونژوگه آنزیمی (TSH Enzyme Conjugate)	یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری	دو ویال ۱۱ میلی‌لیتری
محلول شستشو (Wash Solution-50X)	یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری	یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری
محلول رنگزا A (Substrate Solution A)	یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	دو ویال ۶/۵ میلی‌لیتری
محلول رنگزا B (Substrate Solution B)	یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	دو ویال ۶/۵ میلی‌لیتری
محلول متوقف‌کننده (Stop Solution)	یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری	یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری
محلول کنترل (TSH Control)	ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری	ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری
برچسب مخصوص پلیت	یک ورق	دو ورق

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 گردیده است.

**مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:**

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

**احتیاط در استفاده از کیت:**

- 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 نمایید.
- کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نشود.
- توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.

۴) محتویات کیت با منشأ 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) برای این آزمایش از نمونه‌های سرم استفاده کنید. 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) 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.

۳) 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 متجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.

**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 دمای 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: قبل از شروع استفاده از کیت، کل حجم محلول رنگزا B (ویال روشن) را داخل محلول رنگزا A (ویال تیره) خالی نمایید و برای انجام تست تا پایان مصرف کیت استفاده نمایید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

**روش انجام آزمایش:**

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت، کنترل و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، نمونه‌ها 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 همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۸-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.






۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی TSH به هر چاهک اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بیوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ 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 به آرامی 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.

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

#### علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

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

#### References:

1. McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
2. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
3. Tietz. Reference information for the clinical laboratory. Hn Textbook of clinical chemistry. Burtis, CA, Ashwood, RA, WB, Saunders. Philadelphia; 1999.

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

**توجه:** چنانچه از دستگاه‌های ایژا پروسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.

No.	Sample (µIU/mL)	% Bias			
		1/2	1/4	1/8	1/16
1	2.2	-1.8	1.3	-2.2	-1
2	5.8	2.4	-1.4	-0.9	-2.7
3	9.9	-2.4	2.2	-1.4	-2

#### (۵) بررسی ویژگی-آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)

ویژگی این آزمایش با کمک اضافه کردن ترکیبات مندرج در جدول زیر به نمونه سرم، سنجش شد. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت غلظت ماده اضافه شده به غلظت TSH مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب ارزیابی شد. 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.

Analyte	Cross Reactivity	Concentration
hFSH	<0.0001	1000 ng/mL
hLH	<0.0001	1000 ng/mL
HCG	<0.0001	1000 ng/mL

#### (۶) 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  $0.1 \mu\text{IU/mL}$  تعیین گردید.

$$\text{LOD} = \text{LOB} + 1.645 \text{SD}_s$$

$$\text{LOB} = \text{Mean}_b + 1.645 \text{SD}_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

#### (۷) بررسی پایداری (Stability)

**Accelerated Stability Test:** بررسی پایداری کیت به مدت

۴ 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 ۲

سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی نتایج به‌صورت هر

سه ماه یک بار می‌باشد.

Normal Range For Adults
0.4 - 5 (µIU/mL)

#### 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 در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش  $CV < 10\%$  است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean TSH (µIU/mL)	0.95	5.2	9.6
SD (µIU/mL)	0.05	0.25	0.43
CV (%)	5.3	4.8	4.5

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

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت کاری) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش  $CV < 10\%$  است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean TSH (µIU/mL)	0.77	6.7	11.7
SD (µIU/mL)	0.05	0.41	0.69
CV (%)	6.5	6.1	5.9

#### (۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و سطح TSH در ترکیب به‌دست آمده اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش،  $\text{Bias} < 10\%$  نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (µIU/mL)	Added (µIU/mL)	Exp. (µIU/mL)	Obs. (µIU/mL)	% Rec.
1	0.54	7.98	4.26	4.37	102.6
2	1.40	0.41	0.9	0.94	104.4
3	7.23	3.86	5.54	5.46	98.6

#### (۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)

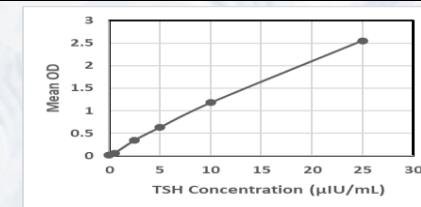
در این تست غلظت TSH در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش،  $\text{Bias} < 10\%$  است.

(۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید. توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به‌دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به‌مدت ۱۵ دقیقه افزایش دهید.

(۷) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

(۸) مقدار جذب نوری را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج فرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر آمده شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (µIU/mL)
Cal. A	A1	0.011	0.013	0
	B1	0.014		
Cal. B	C1	0.058	0.06	0.5
	D1	0.062		
Cal. C	E1	0.343	0.349	2.5
	F1	0.354		
Cal. D	G1	0.644	0.633	5
	H1	0.621		
Cal. E	A2	1.191	1.177	10
	B2	1.163		
Cal. F	C2	2.591	2.552	25
	D2	2.513		



#### مقادیر مورد انتظار برای تست TSH به روش ایژا

شرکت تولید کننده کیت مقادیر مورد انتظار برای این تست را به قرار زیر مشخص کرده است. هرچند؛ این مقادیر برای آنالیت مورد نظر باید توسط آزمایشگاه تعیین گردد.