

# MONOKIT

کیت اندازه گیری هورمون TSH در سرم انسان

**TSH ELISA Kit**  
96 Tests : Cat. No: 0534-96  
192 Tests : Cat. No : 2034-192  
Rev: A2 (1402/09/25)

## مقدمه:

TSH هورمونی گلیکوپروتئینی است که توسط سلولهای تیروتروپ هیپوفیز قدامی ساخته و ترشح می شود و مسئول تنظیم ترشح هورمون های تیروکسین و تری یودوتیرونین توسط غده تیروئید است. تنظیم ترشح هورمون TSH از طریق هورمون آزادکننده تیروتروپین (TRH) صورت می پذیرد. سوماتواستاتین هورمون دیگری است که توسط هیپوتالاموس تولید و به عنوان تنظیم کننده منفی TSH شناخته می شود. مقادیر هورمون های T3 و T4 در خون نیز 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 می گردد. به این ترتیب، TSH یکی از مارک های تشخیصی هایپر تیروئیدسم یا هایپو تیروئیدسم است. حیطة کاربرد این کیت اندازه گیری کمی سطح TSH در نمونه سرم انسان به روش الیزا است.

## اصول آزمایش:

این تست بر اساس الیزای ساندریج طراحی شده است. در این روش بی حرکت سازی کمپلکس ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در سطح چاهک و آنتی بادی مونوکلونال بیوتینیل شده ضد TSH صورت می گیرد. با مخلوط شدن آنتی بادی بیوتینیل شده، آنتی بادی متصل به HRP و سرم حاوی آنتی ژن، واکنش بین آنتی بادی ها و آنتی ژن بدون هیچ رقابتی صورت می گیرد. میزان کمپلکس های ایمنی و فعالیت آنزیم، با غلظت TSH سرم، ارتباط مستقیم دارد. پس از شستشوی چاهک ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی تولید می شود 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 می گردد.

## 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 غلظت های ۰،۰/۵، ۰،۲/۵، ۰،۵/۱۰ و ۰،۲۵/۲۵ μIU/mL	یک سری ویال با غلظت های متفاوت	یک سری ویال با غلظت های متفاوت
محلول کوژوگه انزیمی (TSH Enzyme Conjugate)	یک ویال ۱۱ میلی لیتری	دو ویال ۱۱ میلی لیتری
محلول شستشو (Wash Solution-50X)	یک ویال ۲۰ میلی لیتری	یک ویال ۲۰ میلی لیتری
محلول رنگزا A (Substrate Solution A)	یک ویال ۶/۵ میلی لیتری	دو ویال ۶/۵ میلی لیتری
محلول رنگزا B (Substrate Solution B)	یک ویال ۶/۵ میلی لیتری	دو ویال ۶/۵ میلی لیتری
محلول متوقف کننده (Stop Solution)	یک ویال ۱۲ میلی لیتری	یک ویال ۱۲ میلی لیتری
محلول کنترل (TSH Control)	ویال (های) ۰/۵ میلی لیتری	ویال (های) ۰/۵ میلی لیتری
برجسب مخصوص پلیت	یک ورق	دو ورق

توجه ۱: کلیه محلول ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است. توجه ۲: مقادیر کنترل (ها) در برگه COA درج شده است.

## مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند:

- دستگاه خوانش گر 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 کیت ها و یا شماره های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
- کلیه محلول ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول های که تاریخ انقضاء آن ها گذشته است، استفاده نکنید.
- توجه فرمایید محلول ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBSAg، HIV1/2 و HCV بررسی شده اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری زا با استفاده از روش های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل های ایمنی انجام شوند.

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 جداً جلوگیری کنید. ۶) نمونه بیماران، کنترل ها، چاهک ها و سر سمپلر های استفاده شده باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

## جمع آوری، آماده سازی و نگهداری نمونه:

۱) نمونه مناسب برای انجام این تست سرم است. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه گیری در درستی نتایج به دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه های ایکتريک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید. ۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین ( $>5 \text{ mg/day}$ ) را دریافت می کنند، نمونه گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود. ۳) درب ظرف نمونه ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و حداکثر تا یک ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه ها خودداری کنید.

## آماده سازی و نگهداری معرف ها:

۱) آماده سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید. ۲) آماده سازی محلول رنگزا: محلول های رنگزا A و B را با حجم های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی لیتر محلول آماده مصرف ۱ میلی لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی لیتر از محلول رنگزا B اضافه کنید) و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی آنکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید. ۳) حجم ۵۰ میکرو لیتر از محلول متوقف کننده واکنش به کلیه چاهک ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

## روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت، کنترل و نمونه ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی گراد) رسیده اند. کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.

۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک ها را همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۵۰ میکرو لیتر از کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل در چاهک های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه، کنترل یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک ها ریخته شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول کوژوگه انزیمی به هر چاهک اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴) چاهک ها را با برجسب مخصوص پلیت بشویند و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق آنکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک ها را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرو لیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) بشوید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت گیر بزنید. به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت اقدام نمایید.

۶) حجم ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول رنگزای آماده شده (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی آنکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می توانید زمان آنکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۷) حجم ۵۰ میکرو لیتر از محلول متوقف کننده واکنش به کلیه چاهک ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

1- <http://www.samantajhiz.com/Support.aspx>

### 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>OBL</b>	Own brand Labeling
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

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

ویژگی این آزمایش با اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مندرج در جدول زیر به نمونه سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین دوز ماده اضافه شده به دوز 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  $10 \pm 1.0$  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.  
 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.

### 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 نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش  $\text{CV} < 10\%$  است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean TSH ( $\mu\text{IU/mL}$ )	1.83	4.74	16.72
SD ( $\mu\text{IU/mL}$ )	0.09	0.23	0.75
CV (%)	4.9	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 نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش  $\text{CV} < 10\%$  است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean TSH ( $\mu\text{IU/mL}$ )	0.95	6.39	14.24
SD ( $\mu\text{IU/mL}$ )	0.06	0.37	0.67
CV (%)	6.3	5.7	4.7

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

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

No.	Sample ( $\mu\text{IU/mL}$ )	Added ( $\mu\text{IU/mL}$ )	Exp. ( $\mu\text{IU/mL}$ )	Obs. ( $\mu\text{IU/mL}$ )	% Rec.
1	0.65	0.94	0.79	0.75	94.9
2	2.30	3.65	2.97	3.13	105.4
3	8.25	4.72	6.48	6.13	94.6

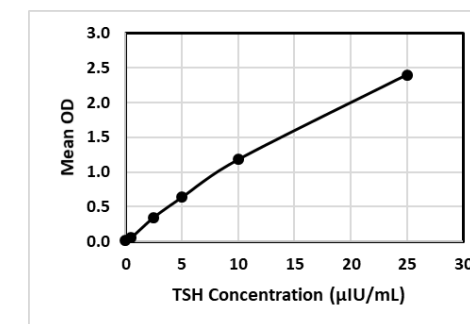
#### ۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)

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.

No.	Sample ( $\mu\text{IU/mL}$ )	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	3.62	-2.8	-1.2	-1.2	-2.5
2	6.80	-1.0	-2.4	-2.9	-3.0
3	11.91	3.4	-2.0	-1.8	-1.4

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 رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. ( $\mu\text{IU/mL}$ )
Cal. A	A1	0.012	0.014	0
	B1	0.016		
Cal. B	C1	0.067	0.062	0.5
	D1	0.056		
Cal. C	E1	0.357	0.350	2.5
	F1	0.343		
Cal. D	G1	0.641	0.639	5
	H1	0.637		
Cal. E	A2	1.185	1.182	10
	B2	1.179		
Cal. F	C2	2.554	2.398	25
	D2	2.241		



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

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

Normal Range For Adults
0.4 - 5 ( $\mu\text{IU/mL}$ )