SANABiO

# کیت الایزا برای تعیین غلظت هورمون محرک غده تیروئید انسانی

Human Thyroid Stimulating Hormone (TSH) ELISA Kit

کد محصول : SB - TSH-103

## ۱.معرفی

اندازه گیری غلظت سرمی هورمون محرک غده تیروئید (تیروتروپین، TSH) که نوعی گلیکوپروتئین با وزن ملکولی ۲۸/۰۰۰ دالتون بوده و از غده هیپوفیز ترشح می شود، می تواند به عنوان یک شاخص حساس جهت تشخیص بیماری های مختلف غده تیروئید و ارزیابی عملکرد محور هیپوفیز- هیپوتالاموس بکار رود. این هورمون دارای دو زیرواحد بنام زنجیره آلفا با ۸۹ اسید امینه است که با زنجیره آلفای سایر گناداوتروپین ها یکسان می باشد، و زنجیره بتا با ۱۱۵ اسید امینه که مسئول عملیات ایمونولوژیکی و خصوصیات بیولوژیکی این هورمون ها است. مولکول TSH یک ساختار خطی داشته که شامل یک هسته پروتئینی با زنجیرهای جانبی کربوهیدرات است که ۱۶ درصد وزن مولکولی آن را تشکیل می دهد.

هورمون های تیروئیدی T3 و T4، توسط هورمون آزاد کننده تیروتروپین (TRH) هیپوتالاموس، ترشح TSH را از طریق مکانیسم فیدبک منفی تنظیم می کنند. بعبارت دیگر، افزایش غیرطبیعی غلظت خونی T3 و T4 باعث توقف ترشح TSH می شود، همچنین کاهش غلظت T3 و T4 در خون، باعث افزایش ترشح TSH می گردد. افزایش غلظت سرمی TSH اولین و بهترین نشانگر کم کاری اولیه تیروئید می باشد.

## ۲.اصول اندازه گیری

این کیت بر اساس سنجش ایمونولوژیکی ساندویچی تهیه شده است. در این کیت آنتی بادی منوکلونال ضد TSH برروی پلیت پوشش داده شده و دیگری به آنزیم HRP متصل است. نمونه مورد آزمایش که دارای TSH است، در معرض دو آنتی بادی قرار می گیرد. پس از زمان انکوباسیون، چاهک ها تخلیه شده و شستشو داده می شوند تا آنتی بادی متصل به آنزیم HRP اضافی خارج گردد. سپس سوبسترای آنزیم HRP که محلول TMB است اضافه شده و پس از گذشت زمان انکوباسیون، رنگ آبی ایجاد می شود. شدت رنگ بطور مستقیم با غلظت TSH در نمونه ها متناسب است. استانداردهای TSH با غلظت مشخص، همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که براساس منحنی استاندارد جذب نور در مقابل غلظت T S H، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید. زمان کلی انجام پروسه سنجش حدود یک ساعت و سی دقیقه می باشد.

## ۱.معرف ها:

### ۳-۱- مواد موجود در کیت:

۱-کالیبراتورها (استانداردهای TSH) - 1 ml/vial -[1-6]

۶ ویال یک میلی لیتری از استاندارد با غلظت های ۰، ۰/۵، ۲/۵، ۵، ۱۵ و ۳۰ براساس µIU/ml که در سرم نرمال انسانی تهیه شده است.

۲-سرم کنترل- 1 ml/vial

یک ویال کنترل غلظت TSH که باید در محدوده ذکر شده در برگه کنترل کیفی کیت باشد.

۳-کونژوگه آنزیمی (HRP-Anti-TSH) - 12 ml/vial

این ویال آماده مصرف می باشد.

۴-پلیت های پوشش داده شده- ۹۶ چاهک جداشدنی

یک پلیت ۹۶ چاهکی که با آنتی بادی علیه TSHپوشش داده شده است.

۵-محلول شستشو دهنده غلیظ (20X) - 25 ml/vial

طبق روش ذکر شده در بخش ۶ مصرف می شود.

۶-محلول-TMB 12 ml/vial

یک ویال حاوی تترامتیل بنزوئیدین (TMB) در بافر و آماده مصرف

۷-محلول متوقف کننده واکنش- 12ml/vial

یک ویال حاوی اسید قوی (اسیدسولفوریک یک نرمال)

۸-چسب پلیت

۹-بروشور کیت

### ۳-۲- مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

سمپلر ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری، آب دیونیزه، کاغذ جاذب رطوبت، ظرف شیشه ای جهت آماده سازی بافر ها ، تایمر، دستگاه الایزا ریدر

### ۴- موارد احتیاط

۱. از استفاده معرف های کیت پس از تاریخ انقضاء خودداری کنید و از مخلوط کردن یا استفاده از کیت ها با شماره بچ مختلف پرهیز نمائید.

۲. درب ظروف را پس از استفاده ببندید و از تعویض درب ها جدا خودداری کنید.

۳. کیت های باز نشده پس از تحویل باید در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد (یخچال) نگه داری شوند. میکروپلیت باید در کیسه در بسته به همراه ماده جاذب رطوبت نگه داری شود. کیت باید تا تاریخ انقضاء استفاده شود. برای اطلاع از تاریخ انقضاء به برچسب کیت مراجعه شود.

۴. فرآیند شستشو خیلی مهم است. شستشوی ناکافی باعث کاهش دقت و افزایش کاذب جذب می شود.

۵. از تماس محلول متوقف کننده واکنش (1N H2SO4) با پوست خودداری کنید. در صورت تماس، با آب فراوان آنرا بشوئید.

۶. در این کیت از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر HbsAg و HIV منفی بوده اند.

## ۵.تهیه و جمع آوری نمونه

آزمایش را باید بر روی نمونه های سرمی انجام داد. نمونه های شدیدا همولیزه و دارای چربی باید حذف شوند. نمونه ها را می توان برای دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد و برای زمان های طولانی تر (تا سی روز) در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمود. از انجماد و ذوب مکرر نمونه ها باید خودداری کرد. در مواردی که مقدار TSH نمونه بیش از ۳۰ µIU/ml باشد، نمونه را با استاندارد صفر رقیق نموده و سپس آزمایش را تکرار نمائید.

## ۶.آماده سازی معرف ها

۱.قبل از استفاده کلیه معرف های کیت را سر و ته (invert) نمایید.

برای تهیه محلول شستشو، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب دیونیزه رقیق نمائید.

## ۷.روش انجام آزمایش

**با توجه به حساسیت بالای تست توصیه می شود حداقل یک ساعت قبل از شروع آزمایش، کیت را در دمای اتاق (۲۲-۲۷ درجه سانتیگراد) قرار دهید.**

توصیه می شود این آزمایش توسط افراد مجرب و آموزش دیده انجام شود. زمانی که پروسه شروع می شود تمام مراحل باید بدون وقفه تا انتها پیش رود.

۱.تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار را مشخص کنید. استریپ های اضافی را در کیسه های زیپ دار قرار داده و در دمای ۲-۸ درجه و دور از نور نگهداری کنید.

۲. ۰۵/۰ میلی لیتر (50µl) از استانداردها، سرم کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر چاهک بریزید.

۳. ۱/۰ میلی لیتر (100µl) از کونژوگه آنزیمی (HRP-Anti-TSH) را به تمام چاهک ها اضافه کنید.

۴.۴- پلیت را بمدت ۶۰ - ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها خوب مخلوط شوند. سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهک ها را بمدت یک ساعت در درجه حرارت دمای اتاق (۲۸ - ۲۲ درجه سانتیگراد) و تاریکی انکوبه کنید.

۵.برچسب را با دت از پلیت جدا کرده و محتویات چاهک ها را خالی یا آسپیره (Aspiration) نمایید.

۶. ۳۰۰ میکرولیتر از بافر شستشو آماده مصرف به هر چاهک اضافه و همراه با ضربه زدن به پلیت خالی نمایید. این مرحله ۴ بار تکرار شود (در مجموع ۵ بار). در پایان چاهک ها بر روی پارچه جاذب کاملا آبگیری شود. برای انجام این مرحله از دستگاه الایزا واشر اتوماتیک نیز می توان مطابق پروتکل مربوطه استفاده نمود.

۷. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول TMB به تمامی چاهک ها اضافه کنید. (استفاده از سمپلر چند کاناله دقت کار را بیشتر می نماید) و آنها را بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

۱۰۰.۱ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همه چاهک ها اضـــافه کنید و بمدت ۲۰ ثانیه ضربه ملایم بزنید . خیلی مهم است تا مطمئن شوید رنگ آبی کاملاً به رنگ زرد تغییر پیدا کرده است.

۲.جذب نور هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید. قرائت جذب نوری باید حداکثر تا ۳۰ دقیقه پس از اتمام آزمایش انجام شود.

## ۸. محاسبه نتایج

. جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دســتگاه الایزاریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید.

۲. با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آنها نمودار (Point to Point) رســم کنید به این صــورت که جذب نوری اســتانداردها را روی محور عمودی (محور Y) و غلظت آنها را روی محور افقــی (محور X) بــرده و نقطه تلاقــی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد بدست آورید ، سپس نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی بدست آید.

۳. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدســت آورده و روی محور عمودی جای آن را پیدا کنید، ســپس نقطه مذکور را توســط خطی به منحنی وصــل نمایید از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشــان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

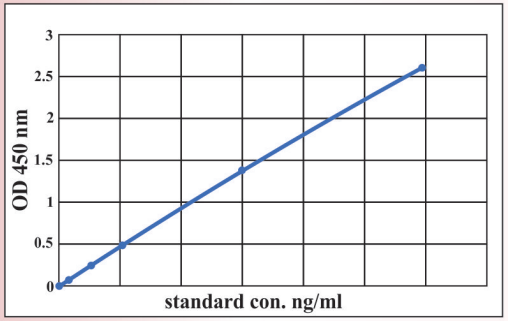
۴. نمونه ای از نتایج و شکل منحنی استاندارد در زیر نشان داده شده است.

**نکته:** مقادیر جذب نوری ارائه شــده در جدول ذیل تنها بعنوان راهنمایی آورده شــده است و هر آزمایشــگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید بدست آورد.

۴. نمونه ای از نتایج و شکل منحنی استاندارد در جدول شماره ۱ نشـــان داده شده است.

| جذب نوری | استانداردها (µIU/ml) |
|---|---|
| ۰.۰۴ | + |
| ۰.۱۱ | ۰.۵ |
| ۰.۳۱ | ۲.۵ |
| ۰.۵۳ | ۵ |
| ۱.۴۰ | ۱۵ |
| ۲.۶۱ | ۳۰ |

نکته: مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل تنها بعنوان راهنمایی آورده شــده اســت و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید بدست آورد.




## ۹. مقادیر مورد انتظار:

مقادیر طبیعی در سرم افراد نرمال که توسط آزمایشــات مکرر به روش الایزا بدست آمده است به قرار زیر می باشد ولی بدلیل اختلافات سنی، نژادی و رژیم تغذیه، نمی توان برای تمام جمعیت ها محدوده مرجع تعیین کرد و. هر آزمایشــگاه باید محدوده مرجع خود را گزارش نماید.

محدوده طبیعی **0.4 – 6.0 µIU/ml**

## ۱۰.شاخص های اجرایی

### ۱-دقت آزمایش

آزمایشــهای اینترا اسی ( همخوانی غلظت مشــخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و اینتر- اسی( همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایشــات مختلف) با استفاده از ۳ سرم با غلظتهای مختلف ۲۰ بار تکرار شد که ضریب تغییرات به شرح ذیل است:

**اینتراسی**

| نمونه سرم | دفعات تکرار | میانگین (µIU/ml) | انحراف معیار | ضریب تغییرات (CV) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 20 | 0.72 | 0.06 | 8.3 |
| 2 | 20 | 3.4 | 0.19 | 5.5 |
| 3 | 20 | 14.5 | 0.76 | 5.2 |

**اینترا سی**

| نمونه سرم | دفعات تکرار | میانگین (µIU/ml) | انحراف معیار | ضریب تغییرات (CV) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 10 | 1.5 | 0.11 | 7.3 |
| 2 | 10 | 4.2 | 0.25 | 5.9 |
| 3 | 10 | 22.0 | 0.68 | 3.1 |

### ۲-حساسیت آزمایش

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و منهای سه برابر انحراف معیار، حساسیت این کیت برای تعیین مقدار هورمون **TSH** برابر **۲/۰ µIU/ml** بدست آمد.

### ۳-اختصاصیت ازمایش

اختصـاصیت این آزمایش با استفاده از سرم های حاوی LH، FSH و HCG جهت واکنش متقاطع با TSH بررسی شده و هیچگونه تداخلی با این هورمون ها در غلظت های طبیعی دیده نشده است.

### ۴- خطی بودن

به کمک استاندارد صفر رقتهای متوالی سه نمونه سرم با غلظت مشخص از TSH تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت محاسبه شد که در جدول زیر نتایج آورده شده است.

| نمونه سرمی | غلظت اولیه (µIU/ml) | درصد ریکاوی | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1:2 | 1:4 | 1:8 |
| 1 | 2.2 | 98 | 101 | 106 |
| 2 | 10.5 | 99 | 105 | 106 |
| 3 | 33.7 | 101 | 103 | 105 |

### ۵-اثر هوک

آزمایش TSH با این کیت، جهت سرم هایی با غلظت بسیار بالا (تا غلظت ۲۰۰ µIU/ml) انجام شد که پدیده اثر هوک مشاهده نگردید.


**References:**

1. Spencer,CA, et al,. Interlabratory/intermethod differences in functional sensitivity of immunometric assay of thyrotropin (TSH) and impact on reliability of measurement of subnormal concentration of TSH. Clinical chemistry, 41,367 (1995).
2.Helenius T., Tikanoja S.( 1986) A sensitive and practical immunoradiometric assay of thyrotropin. Clin. Chem. 32 :514-518.
3. Cobb W.E., Lamberton R.P Jackson I.M.D. (1984) Use of a rapid, sensitive immunoradiometric assay for thyrotropin to distinquish normal from hyperthyroid subjects. Clin. Chem. 30:1558-1560.