www.padyabteb.com

TSH

Thyroid ELISA Kits

REF: PT-ETS-103

IVD

مقدمه

هورمون محرک تیروئید (TSH) توسط سلول‌های قدامی هیپوفیز ترشح می‌شود. این هورمون از دو زنجیره آلفا و بتا که توسط اتصالات غیر کووالانسی بهم متصل شده‌اند، تشکیل شده است. ساختمان زنجیره آلفا شبیه هورمون‌های گلیکوپروتئینی (LH، FSH و HCG) می‌باشد. ویژگی بیولوژیکی مولکول TSH توسط زنجیره بتا مشخص می‌شود. وظیفه اصلی TSH رشد غده تیروئید، تحریک و کنترل ترشح هورمون‌های تیروکسین (T4) و تری یدوتیرونین (T3) است. ساخت TSH توسط هورمون رهاکننده تیروتروپین (TRH) که خود توسط هیپوتالاموس تولید می‌شود تنظیم می‌گردد. غلظت TSH و TRH در خون رابطه معکوسی با غلظت هورمون‌های تیروئیدی T3و T4 دارد. بطوریکه غلظت بالای T3 و T4 در خون با کاهش رهایی TRH از هیپوتالاموس و به دنبال آن کاهش رهایی TSH از هیپوفیز قدامی همراه می‌گردد. با کاهش غلظت هورمون‌های تیروئید این عمل معکوس خواهد شد. این فرایند به‌عنوان یک مکانیسم باز خورد منفی و مسئول حفظ غلظت مناسب این هورمون‌ها در خون شناخته شده است. تعیین غلظت سرمی یا پلاسمایی هورمون محرک تیروئید (TSH یا تیروتروپین) به عنوان یک روش حساس در تشخیص پرکاری تیروئید اولیه و ثانویه شناخته شده است.

سطح سرمی بالای TSH در هیپوتیروئیدی اولیه به علت ناکارایی تیروئید و هیپرتیروئیدی ثانویه به علت ناکارایی هیپوفیز و همچنین سطح سرمی پایین TSH در هیپرتیروئیدی اولیه و هیپرتیروئیدی ثانویه به علت آنومالی‌های هیپوفیز و یا هیپوتالاموس دیده می‌شود.

اساس روش اندازه‌گیری

در این تست الایزا، کیت به روش ساندویچی و با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی بر علیه یکی از شاخص‌های آنتی‌ژنیک مولکول TSH تهیه شده است. به این شکل که یک آنتی‌بادی مونوکلونال TSH برای تثبیت بر روی فاز جامد و یک آنتی‌بادی TSH دیگر برای کونژوگاسیون با آنزیم (HRP) مورد استفاده قرار گفته است.

پس از اضافه شدن نمونه سرم بیمارها مولکول TSH با آنتی‌بادی مونوکلونال TSH و آنتی بادی TSH واکنش داده و بین آنتی‌بادی متصل به فاز جامد و آنتی بادی کنژوکه شده با آنزیم ساندویچ می‌گردد. مقدار کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهک‌ها با غلظت TSH در نمونه متناسب است.

پس ازگذشت زمان انکوباسیون (۴۵ دقیقه) در دمای اتاق و شستشو چاهک‌ها توسط محلول شستشو دهنده و اضافه کردن محلول رنگزا و انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه رنگ آبی ظاهر می‌گردد. با اضافه کردن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شود. شدت رنگ در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری می‌گردد.

شدت رنگ با غلظت TSH در نمونه سرم رابطه مستقیم دارد.

محتویات کیت

ردیف	نام محصول	حجم/ تعداد
1	پلیت پوشانده شده با آنتی بادی مونوکلونال Anti-TSH (Anti TSH Coated plate)	1X96 test
2	محلول آنزیم کونژوگه آماده مصرف (TSH Enzyme conjugate)	1X6 ml
3	استاندارد در غلظت 0.0 µIU/ml	1X1 ml
	استاندارد در غلظت 0.5 µIU/ml	1X1 ml
	استاندارد در غلظت 2.5 µIU/ml	1X1 ml
	استاندارد در غلظت 5 µIU/ml	1X1 ml
	استاندارد در غلظت 10 µIU/ml	1X1 ml
	استاندارد در غلظت 20 µIU/ml	1X1 ml
	استاندارد در غلظت 40 µIU/ml	1X1 ml
4	بافر شستشوی غلیظ 20X (Wash Buffer)	1X30ml
5	محلول سوبسترا – رنگزا (Chrom Substrte)	1X11ml
6	محلول متوقف کننده (Stop Solution)	1X6ml
7	سرم کنترل به همراه نگهدارنده (Control serum)	1X1ml
8	برچسب مخصوص پلیت	۱ عدد

+ محلول شستشو، رنگزا و متوقف کننده در همه کیت‌ها مشترک می‌باشند.

+ استاندارها در بافر حاوی نگهدارنده می‌باشند که در مقابل استاندارد 80/550second-irP-WHo کالیبر شده‌اند.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند

1- سمپلرهای ۵۰، ۱۰۰ میکرولیتری

2- آب مقطر

3- دستگاه الایزا ریدر

4- کاغذ جاذب رطوبت

نگهداری کیت

1- کیت در یخچال در دمای ۸°c–۲ نگهداری شود.

2- میکروپلیت‌ها باید در کیسه در بسته به همراه نمگیر نگهداری شود.

3- مدت زمان پایداری کیت تا پایان تاریخ انقضا (یکسال از زمان تولید) نوشته شده برروی برچسب کیت می‌باشد.

4- کیت باز شده حداقل به مدت ۲ ماه در دمای ۸°c–۲ پایدار خواهد بود.

5- محلول شستشوی رقیق شده به نسبت ۱ به ۲۰ به مدت یک هفته در دمای ۸°c–۲ قابل نگهداری و مصرف می‌باشد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه

پس از جداســازی ســرم از نمونه خون بیمار، نمونــه را می‌توان به مدت ۴۸ ســاعت در درمای ۸°c–۲ نگهداری نمود. جهت نگهداری طولانی‌تر، نمونه‌ها باید در دمای ۲۰°c– نگهداری شوند. نمونه‌های ذوب شده باید قبل از آزمایش مخلوط شوند. بهتر است ترجیحاً از نمونه‌های با کدورت بالا، همولیز و لیپمیک استفاده نشود. در ضمن باید از فریز و ذوب مکرر نمونه‌ها (Freeze-Thaw) اجتناب گردد.

نکات قابل توجه

1- کیت فقط جهت استفاده در آزمایشگاه تشخیصی کاربرد دارد.

2- استفاده از سر سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه جهت دقت و صحت بیشتر.

3- شستشو چاهک‌ها به صورت کامل جهت نتیجه بهتر.

- بررسی چاهک‌ها از نظر وجود حباب.
- خارج کردن حباب از چاهک‌ها با زدن ضربه آهسته به پلیت.

4- عدم ترکیب اجزاء کیت با سری ساخت متفاوت.

5- جلوگیری از تعویض درب معرف‌ها.

6- جلوگیری از تماس معرف به ویژه معرف متوقف کننده واکنش با پوست (در صورت تماس با آب کافی شستشو داده شود).

7- از استعمال دخانیات، خوردن و آشامیدن اجتناب شود.

8- از پی‌پت کردن مواد با دهان پرهیز شود.

9- از دستکش و لباس مناسب استفاده شود.

+ جهت ســاخت برخی از اجزای این کیت از سرم انسانی که از نظر HCV، HbsAg، HIV منفی می‌باشد، استفاده شده است.

آماده سازی معرف‌ها

1- همه معرف‌ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (۳۰–۱۸ درجه سانتی گراد) برسند.

2- تهیه محلول شستشو: برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمائید.

نکته‌های مهم

1- توصیه می‌شود که بیشتر از ۳۲ چاهک در هر ران کاری استفاده نشود. اگر پی‌پت به صورت دستی انجام می گیرد، پی‌پت کردن همه استانداردها، نمونه‌ها ، کنترل‌ها باید در ۵ دقیقه تمام شود. برای پی‌پت کردن کل پلیت ۹۶ تستی باید از دستگاه اتوماتیک استفاده شود.

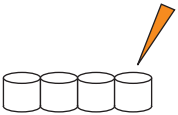
2- فرایند شستشو خیلی مهم است. شستشوی ناکافی باعث کاهش دقت و افزایش کاذب جذب می شود.

3- در مواردی که مقدار TSH نمونه بیش از ۴۰μIU/ml باشد نمونه را با استاندارد صفر رقیق و سپس آزمایش را تکرار کنید.

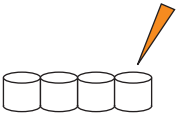
روش انجام آزمایش

1- انتخاب تعدادچاهک‌های کوت شــده برای اســتانداردها، کنترل و نمونه‌هــای بیمار بصورت دوتایی و قــراردادن مابقی چاهک‌ها در کیسه مخصوص به همراه نمگیر و بستن درب آن.

2- ۵۰µl اســتانداردها، سرم کنترل و نمونه‌ها به چاهک‌ها اضافه نمایید.



3- ۵۰µl آنزیم کونژوگه HRP به تمام چاهک‌ها اضافه نمایید.



4- پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید و ســپس درب چاهک‌ها را با برچســب مخصوص پلیت پوشــانده و ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.

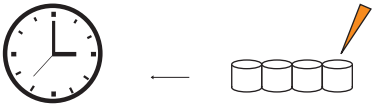
5- محتویــات چاهک‌هــا را خالــی کنیــد و چاهک‌هارا ۵ بــار با ۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشوی آماده شستشو دهید. سپس چاهک‌ها را وارونه کنید و همراه با تکان دادن خالی کنید و در انتهای شستشو بــا ضربات ملایم بر روی کاغذ جاذب تمامی مایع موجود در چاهک‌ها را تخلیه نمایید.

محتویات چاهک‌ها تخلیه شود

۵ بار شستشو با ۳۵۰ میکرولیتر بافر

به وسیله کاغذ جاذب خشک کنید

6- ۱۰۰µl از سوبسترای آماده مصرف به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید.



۱۰۰ λ محلول سوبسترای (TMB)

۱۵ دقیقه انکوبه در دمای اتاق ۲۵°C

7- ۵۰ µl از محلــول متوقف کننده به همــه چاهک‌ها اضافه کنید. سپس جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت کنید. ســنجش جذب نــوری باید حداکثر تا ۱۵ دقیقه پس از انجام آزمایش انجام شود.

۵۰ میکرولیتر محلول STOP به تمام چاهک‌ها

ELISA READER

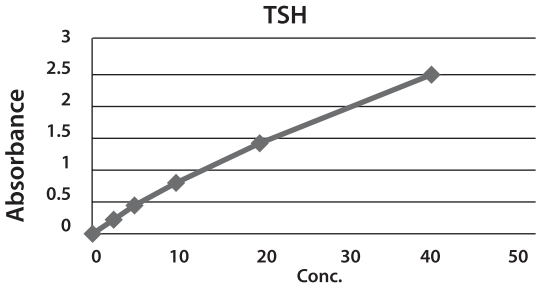
محاسبه نتایج

1- با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها (محور Y) و غلظت مشـخص آنها (محور X) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استانداردی رسم کنید.

2- میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سـپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

راهنمای محاسبه

مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل تنها به عنوان راهنمایی آورده شــده است و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید بدست آورد.



ردیف	مقدار استاندارد (µIU/ml)	جذب
۱	۰	۰/۰۲۵
۲	۰/۵	۰/۰۷۲
۳	۲/۵	۰/۲۱
۴	۵	۰/۴۳
۵	۱۰	۰/۸
۶	۲۰	۱/۴
۷	۴۰	۲/۴۵

مقادیر طبیعی

بدلیل اختلافات سـنی، نژادی و رژیم تغذیـه، نمی‌توان برای تمام جمعیت‌ها محدوده مرجع تعیین کرد. بنابراین هر آزمایشـگاه باید محدوده مرجع خود را گزارش نماید. مقادیر طبیعی در سـرم افراد نرمال که توسـط آزمایشات مکرر به روش الایزا بدست آمده است به قرار زیر می‌باشد:

محدوده طبیعی : ۰/۳۵ – ۵/۳ µIU/ml

خصوصیات کیت

1-حساسیت آنالیتیکال (حد تشخیص) :

برای تعیین حد تشـخیص ۲۰ مرتبه استاندارد صفر آزمایش شد. حـد تشـخیص از ۲ انحراف معیار (SD) بالاتـر از میانگین جذب در غلظت صفر بدست آمد. حد تشخیص برای این کیت ۰/۰۵ µIU/ml بدست آمد.

2- دقت:

برای محاسـبه میزان دقت در یـک روز (درون سـنجی) و روزهای مختلف، (میان سـنجی) آزمایش بر روی ۳ نمونه سرم ۲۰ بار تکرار شد که ضریب تغییرات به شرح ذیل است.

دقت درون سنجی				
نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (µIU/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
۱	۲۰	۰/۷۹	۰/۰۶۵	۸/۲
۲	۲۰	۳/۷۲	۰/۲۷۴	۷/۵
۳	۲۰	۷/۱۷	۰/۶۹	۹/۶

دقت میان سنجی				
نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (µIU/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
۱	۲۰	۰/۸۲	۰/۰۵۴	۶/۶
۲	۲۰	۳/۶۳	۰/۱۸۸	۵/۲
۳	۲۰	۶/۸۲	۰/۶۵	۹/۶

3- ویژگی:

واکنش متقاطع TSH با هورمون‌های FSH، LH و hCG به وسیله اضافه کردن این هورمون‌ها به استاندارد صفر تعیین گردید.

نوع ماده	غلظت	درصد تداخل (%)
FSH	500 mIU/ml	0.008
LH	500 mIU/ml	0.009
HCG	25000 IU/L	0.001

4- خطی بودن:

سه نمونه مختلف سرمی با استاندارد صفر به نسبت‌های ۱:۲ ، ۱:۴ و ۱:۸ رقیق شـدند. سـپس غلظت TSH در آنها با استفاده از کیت محاسبه شد که نتایج ذیل بدست آمد.

نمونه سرمی	غلظت اولیه (µIU/ml)	Recovery %		
		۱:۲	۱:۴	۱:۸
۱	۱۲/۲	۹۸	۱۰۱	۱۰۶
۲	۲۰/۵	۹۹	۱۰۵	۱۰۶
۳	۳۳/۷	۱۰۱	۱۰۳	۱۰۵

5- اثر هوک:

در این کیت، اثر هوک تا غلظت µIU/ml ۴۰۰ دیده نشد.

+ References

1. Hopton M. R, et al Clinical Chemistry, 32, 691 (1986)
2. Caldwell, G. et al. Lancet, I, 1117, (1985)
3. Young, D. S, et al Clinical Chemistry 21, 3660 (1975)
4. Spencer, CA, et al Clinical Chemistry 41, 367 (1995)
5. Beck-Peccoz P, et al Eur. J. Endocrinol 131: 331-340 (1994)
6. Bravemann, L. E, Clinical Chemistry 42: 174-181 (1996)
7. کتاب جامع الایزا – دکتر ناصر ملک نیا

پاره‌ای نکات علمی در خصوص رفع مشـکلات احتمالی در کیت‌های الیزا :

	علت مشکل	راه حل
پایین بودن OD استاندارد ها و نمونه‌ها	افـت و یـا آلودگـی کونژوگه	تکـرار تسـت بـا کونژوگه جدید
	پاییـن بـودن دمـا و یا کوتـاه بـودن زمان انکوباسـیون، بـه دما نرسـیدن محلول‌های کیت و نمونه بیماران	• دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تسـت را تکرار کنید • قبل از شروع آزمایش کیت و نمونه بیماران به دمای اتاق برسد.
	PH نامناسـب و یـا غلظـت بـالای Wash Buffer، شستشـوی نامناسـب و یا خشـک شدن چاهک‌ها	• PH آب مقطـر را چک کنید و تسـت را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. • پـس از شستشـوی کامل و تخلیه چاهک‌هـا بلافاصله تست را ادامه دهید.
	نگهـداری نامناسـب کیـت و عـدم رعایت زنجیره سرد	• پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه‌کنید. • پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.

	طول موج خوانش نامناسب (۴۰۵ نانومتر بجای ۴۵۰ نانومتر)	• تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. • طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
عدم تولید رنگ در چاهک‌ها	استفاده از مواد سایر کیت‌ها	تکرار تست با مواد همان کیت
	انجام نشدن مرحله‌ای از تست	تکرار تست
	آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید	تکرار تست با محلول کونژوگه جدید
صحیح نبودن نمودار	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید

صحیح نبودن نمودار	پی‌پتینگ نامناسب	• استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف. • از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده‌کنید. • توجه کنید نوک سمپلر محکم به‌سمپلر متصل باشد. • توجه کنید در هنگام پی‌پتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود.
	PH نامناسب و یا غلظت بالای، Wash Buffer	PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید.
	شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها	پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید.

بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD	آلودگی استاندارد صفر	تکرار تست با استانداردهای جدید
	آلودگی محلول رنگزا	استفاده از محلول رنگزا جدید
	آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نا مناسب	• عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. • تمام سوزن‌های دستگاه واشر را چک کنید.
	طول موج نامناسب در خوانش	• تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. • طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. • از فیلتر ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید.

	آلودگی محلول Stop	تکرار تست با محلول Stop جدید
	ایجاد وقفه در خوانش	بلافاصله بعد از Stop کردن تست، یا حداکثر تا ۱۵ دقیقه پلیت را بخوانید.
عدم تکرار پذیری مناسب	پی‌پتینگ نا مناسب	• استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف • از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید. • توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. • توجه کنید در هنگام پی‌پتینگ حباب وارد نشود. • توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد. • کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلرها.

عدم تکرار پذیری مناسب	طولانی شدن زمان انجام تست	فاصله زمانی بین اضافه کردن استانداردها و نمونه نباید بیشتر از ۱۰ دقیقه باشد. در این صورت نتایج قابل اعتماد نیست.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	• پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. • پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.
	باقی ماندن کونژوگه در لبه چاهک‌ها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها.	پی‌پتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	وجود حباب در چاهک‌ها	در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک‌ها نباشد.
	کثیف بودن کف چاهک‌ها	کف چاهکها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید.
	مخلوط نشدن محلول‌های کیت	قبل از استفاده از ویال محلول‌ها را به آرامی تکان دهید.

خلاصه روش آزمایش

معرف‌ها	استانداردها	نمونه‌ها
استانداردها	۵۰µl	–
نمونه‌ها	–	۵۰µl
کونژوگه	۵۰µl	۵۰µl

در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه نمایید.

۵ بار با ۳۵۰µl محلول بافرشستشو رقیق‌شده، شستشو دهید و با دقت محتویات را خالی کنید.

محلول رنگزا	۱۰۰ µl	۱۰۰ µl

به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی انکوبه نمایید.

محلول متوقف‌کننده	۵۰ µl	۵۰ µl

جـذب نوری هر چاهـک در طول موج ۴۵۰ nm و فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm قرائت شود.

www.padyabteb.com

PADYABTEB
Producer of Diagnostic Products

دفتر فروش و خدمات پس از فروش:

تهران . خیابان ولی‌عصر (عج). بالاتر از میدان ونک . خیابان عطار . ضلع جنوبی میدان عطار.
پلاک ۳۲. طبقه دوم **تلفن:** ۸۸۶۴۹۰۷۶ (۰۲۱) **خدمات پس از فروش:** ۰۹۱۲۹۴۰۹۱۲۴

کارخانه:

شهرک صنعتی اشتهارد . بلوار ابوریحان بیرونی . بلوار غزالی غربی . خیابان لادن ۲
تلفن: ۸ ـ ۳۷۷۷۵۵۳۱ (۰۲۶) **فکس:** ۳۷۷۷۵۵۲۹ (۰۲۶)

TRANSPACIFIC CERTIFICATION
TCL
ISO 13485:2012

GMP
IQC Intelligent Quality Control
Pharmaceutical Industry Quality Management

ISO 9001:2015
IQC Intelligent Quality Control
Quality Management System

ISO 10002:2014
IQC Intelligent Quality Control
Customer Quality Management System

eztest
ELISA Kits