کیت ایمونو آنزیماتیک (EIA) پادتن علم

TSH

☐ ۹۶ تستی ☐ ۱۹۲ تستی

موارد استفاده:
تعیین کمّی TSH در سرم یا پلاسما

I. مقدمه

هورمون TSH (Thyroid Stimulating Hormone) یا تیروتروپین، گلیکوپروتئینی با وزن ملکولی ۲۸ kDa ، از سلول‌های لوب قدامی هیپوفیز ترشح می‌شود. مولکول TSH از دو زنجیرهٔ α و ß ساخته شده است که با پیوندهای غیر کووالانسی به هم متصل شده‌اند. برخلاف زنجیرهٔ اختصاصیß که مسئول خصوصیات هورمونی و ایمونولوژیکی TSH است، زنجیرهٔ α شباهت ساختمانی زیادی با زنجیرهٔ α هورمون‌های HCG، LH و FSH دارد. تحریک ترشح TSH توسط یک تری پپتید هیپوتالامیک به نام هورمون آزاد کننده تیروتروپین (TRH) انجام می‌شود. همچنین افزایش غلظت T3 وT4 آزاد با مکانیسم فیدبک منفی باعث ترشح TSH می‌گردد. از طرف دیگر، این هورمون پس از واکنش با گیرنده‌های اختصاصی غشای سلول‌های تیروئید، موجب تحریک رشد سلول‌های فولیکولی تیروئیدی و سپس ترشح هورمون‌های T3 و T4 می‌شود[۱-۲].

کاهش این هورمون در موارد پرکاری تیروئید و کم کاری نوع دوم و سوم و افزایش آن در کم کاری نوع اول تیروئید، تومورهای ترشح کننده TSH و هیپوتیروئیدی نوزادان دیده می‌شود[۳-۴].

اندازه‌گیری کاهش یا افزایش TSH سرمی در ارزیابی عملکرد تیروئید مفید است و در تشخیص افتراقی انواع کم‌کاری های تیروئیدی اهمیت دارد[۵].

II. اصول اندازه‌گیری

کیت اندازه‌گیری کمّی TSH بر مبنای سنجش واکنش ایمونوآنزیماتیک بر روی فاز جامد طراحی شده است. در این سیستم از دو آنتی بادی منوکلنال موش که شاخص‌های آنتی ژنیک متمایزی را بر روی مولکول TSH شناسائی می‌کنند، استفاده شده است. ابتدا در حفره‌های پلی استایرن پوشیده شده با آنتی‌بادهای منوکلنال TSH، استانداردها، سرم کنترل ها و نمونه های بیماران ریخته می شود. سپس آنتی‌بادی دوم ضد TSH که به آنزیم پراکسیداز (HRP) متصل شده است به حفره‌ها افزوده می‌شود.

در حین انکوباسیون ، TSH موجود در نمونه‌ها از طرفی به آنتی‌بادی‌های ضد TSHمتصل به پلی استایرن و از طرف دیگر به آنتی‌بادی دوم ضد TSH که به آنزیم پراکسیداز (HRP) متصل شده است وصل میگردد. بعد از انکوباسیون و شستشو، با افزودن سوبسترای TMB (۳ و ´۳ – ۵ و ´۵ تترامتیل بنزیدین) سبب ایجاد رنگ آبی توسط انزیم می شود . شدت رنگ ایجاد شده با غلظت TSH موجود در نمونه‌ها نسبت مستقیم دارد. رنگ‌زائی واکنش آنزیماتیک پس از افزودن محلول متوقف کننده خاتمه می‌یابد و رنگ آبی ایجاد شده به رنگ زرد تبدیل می‌شود. شدت رنگ با اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. برای تعیین غلظت TSH نمونه‌ها ابتدا منحنی جذب نور استانداردها برحسب غلظت TSH آنها رسم و سپس غلظت TSH نمونه از روی منحنی استاندارد تعیین می‌شود.

III.محتویات کیت:

تاریخ انقضا بر روی اجزا کیت (Cat.No.P-TS) درج شده است. دمای مناسب برای نگهداری کیت ۸-۲ درجه سانتی گراد می‌باشد.

محتویات کیت ۹۶ تستی

۱. **پلیت:** پلیت ۹۶ حفره‌ای پوشش داده شده با آنتی‌بادی‌های منو کلنال ضد TSH موش
۲. **استاندارد صفر:** ۱ ویال ۴ میلی لیتری. از استاندارد صفر برای رقیق کردن نمونه ها استفاده می‌شود.
۳. **استانداردها:** ۶ ویال ۱/۰ میلی لیتری محلول سرم‌دار حاوی TSH انسان. غلظت دقیق TSH استانداردها که برمبنای استاندارد سازمان بهداشت جهانی (2nd IRP 80/558) کالیبر شده‌اند، روی برچسب آنها درج شده است.
۴. **کنترل‌های سرمی:** ۲ ویال ۱/۰ میلی لیتری سرم انسان. غلظت دقیق TSH کنترل‌ها روی برچسب آنها درج شده است.
۵. **ردیاب آنزیمی:** یک ویال ۶ میلی لیتری آنتی‌بادی ضد TSH متصل به پراکسیداز (HRP) محلول در بافر PBS، حاوی پروتئین و تیمروزال
۶. **محلول شستشوی غلیظ (۲۰X):** یک ویال ۱۲ میلی لیتری PBS حاوی Tween-20 و تیمروزال.
۸. **محلول رنگ زا:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری بافر H_2O_2 و TMB
۹. **محلول متوقف کننده واکنش:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری H_2SO_4 دو نرمال

محتویات کیت ۱۹۲ تستی

۱. **پلیت:** دو پلیت ۹۶ حفره‌ای پوشش داده شده با آنتی‌بادی‌های منو کلنال ضد TSH موش
۲. **استاندارد صفر:** ۱ ویال ۴ میلی لیتری. از استاندارد صفر برای رقیق کردن نمونه ها استفاده می‌شود.
۳. **استانداردها:** ۶ ویال ۱ میلی لیتری محلول سرم‌دار حاوی TSH انسان. غلظت دقیق TSH استانداردها که برمبنای استاندارد سازمان بهداشت جهانی (2nd IRP 80/558) کالیبر شده‌اند، روی برچسب آنها درج شده است.
۴. **کنترل‌های سرمی:** ۲ ویال ۱ میلی لیتری سرم انسان. غلظت دقیق TSH کنترل‌ها روی برچسب آنها درج شده است.
۵. **ردیاب آنزیمی:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری آنتی‌بادی ضد TSH متصل به پراکسیداز (HRP) محلول در بافر PBS، حاوی پروتئین و تیمروزال
۷. **محلـــول شستشوی غلیظ (۲۰X):** یک ویال ۲۵ میلی لیتری PBS-Tween20 و تیمروزال
۸. **محلول رنگ زا:** یک ویال ۲۵ میلی لیتری بافر H_2O_2 و TMB
۹. **محلول متوقف کننده واکنش:** یک ویال ۲۵ میلی لیتری H_2SO_4 دو نرمال

IV.وسایل مورد نیاز (این وسایل همراه کیت عرضه نمی‌شوند):

۱. دستگاه اسپکتروفتومتر میکروپلیت با دامنه جذب نوری ۳-۰ در طول موج ۴۵۰ نانومتر یا دیفرانسیل ۶۳۰
۲. میکروپیپت ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر و تیپ های یکبار مصرف
۳. آب مقطر یا آب دیونیزه برای رقیق کردن محلول شستشو

V. جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها:

نمونه مناسب برای اندازه‌گیری TSH، سرم یا پلاسمای هپارینه بیمار است. این نمونه‌ها را تا یک هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد می‌توان نگهداری کرد. برای نگهداری نمونه‌ها به مدت طولانی‌تر، سرم یا پلاسمای بیمار را در حجم‌های کم تقسیم و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. بهتر است از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه‌ها اجتناب نمود. برای اندازه‌گیری TSH نمونه‌های منجمد شده، ابتدا نمونه را در دمای اتاق ذوب و سپس با حرکت دست یکنواخت کنید. برای یکنواخت کردن نمونه‌ها از Vortex استفاده نکنید. برای اندازه‌گیری دقیق نمونه‌هائی که TSH آنها بیش از آخرین استاندارد است، ابتدا نمونه‌ها را با استاندارد صفر رقیق و دوباره اندازه گیری کنید. بدیهی است در محاسبه نتایج این نمونه‌ها، ضریب رقت منظور می‌شود.

VI.روش کار:

قبل از شروع کار باید دمای تمامی محلولها به دمای اتاق برسد.

محلول شستشوی غلیظ به نسبت یک به بیست با آب مقطر یا دیونیزه رقیق شود (یک حجم محلول شستشوی غلیظ به ازاء ۱۹ حجم آب). محلول شستشوی رقیق را یک هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد می‌توان نگهداری کرد. درصورت مشاهده کریستال در محلول غلیظ شستشو، ویال را چند دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا محلول یکنواخت شود.

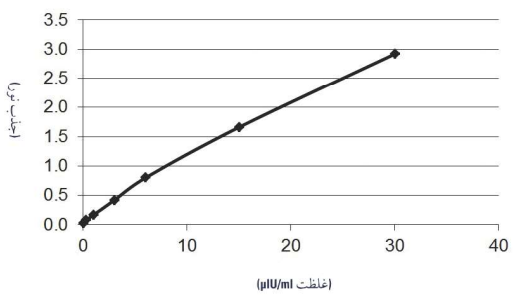
۱. ابتدا ۵۰ میکرولیتر از استانداردها، سرم کنترل‌ها و سرم بیماران را داخل حفره‌ها بریزید و به آن ۵۰ میکرولیتر از کونژوگه ضد TSH اضافه کنید سپس با تکان دادن پلیت، محتویات حفره‌ها را به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط نمائید.
۲. پلیت را ۱ ساعت در دمای اتاق و در محلی تاریک قرار دهید.
۳. حفره ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشوئید.
۴. در هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای TMB بریزید.
۵. پلیت را ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و در محلی تاریک قرار دهید.
۶. ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده واکنش در هر حفره بریزید و به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط کنید.
۷. میزان جذب نوری حفره‌ها را حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با طول موج دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) بخوانید.

VII. محاسبه نتایج:

پس از تعیین میزان جذب نوری استانداردها و نمونه‌ها و ترسیم منحنی، غلظت TSH بیماران را می‌توان محاسبه کرد. در این منحنی که با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (قابل برنامه‌ریزی) و یا به صورت دستی ترسیم می‌شود، محور Y شاخص میزان جذب نور استانداردهای TSH در طول موج ۴۵۰ nm و محور X شاخص غلظت استانداردهای TSH برحسب µIU/ml است. نتایجی که در جدول زیر آمده، فقط مثال است و نباید برای تعیین غلظت نمونه ها از آن استفاده شود.

غلظت TSH (µIU/ml)	جذب نور	نمونه
۰/۰	۰/۰۳	استاندارد A
۰/۳	۰/۰۸	استاندارد B
۱/۰	۰/۱۷	استاندارد C
۳/۰	۰/۴۲	استاندارد D
۶/۰	۰/۸۰	استاندارد E
۱۵/۰	۱/۶۶	استاندارد F
۳۰/۰	۲/۹۲	استاندارد G
۵/۴	۰/۷۳	سرم

برای ترسیم منحنی از غلظت‌های مندرج بر روی ویال استانداردها استفاده نمائید.



VIII. مقادیر طبیعی:

با استفاده از سرم ۱۷۷ فرد بالغ سالم، مقادیر طبیعی TSH با کیت پادتن علم تعیین شده است. نتایج به دست آمده از این آزمایشات نشان می‌دهد که غلظت این هورمون در ٪۹۵ از این افراد بین ۰/۳ µIU/ml تا ۵/۵ با میانگین ۲/۹ µIU/mI است.

توصیه می‌شود هر آزمایشگاه با در نظر گرفتن غلظت سرمی TSH افراد سالم منطقه، دامنه طبیعی آن را تعیین و از آن برای تفسیر نتایج بیماران خود استفاده کند.

IX. ویژگی‌های اختصاصی تست:

۱. حساسیت: به حداقل غلظت TSH که اختلاف جذب نور آن نسبت به جذب نور استاندارد صفر، معنی‌دار باشد حساسیت کیت گفته می‌شود. این مقدار برای کیت TSH ۰/۱ µIU/mI است.

۲. اثرHook: در کیت EIA پادتن علم برای نمونه‌های آنتی ژن TSH تا غلظت ۷۲۰ mIU/mI اثر Hook مشاهده نشده است.

۳. اختصاصی بودن: اختصاصی بودن تست TSH با اندازه گیری غلظت TSH بعد از افزودن مقادیر بالایی از هورمون‌های LH (۵۰۰ mIU/mI)، FSH (۵۰۰ mIU/mI) ، ßHCG (۵۰۰،۰۰۰ mIU/mI) بررسی شده است. نتایج این آزمایشات تداخلی در جدول زیر نشان داده شده است.

هورمون افزوده شده (mIU/mI)	غلظت TSH (µIU/mI) بدون هورمون افزوده شده	با هورمون افزوده شده
LH (۵۰۰)	۰/۵	۰/۵
	۵/۰	۵/۳
FSH (۵۰۰)	۰/۵	۰/۶
	۵/۰	۵/۱
ßHCG (۵۰۰.۰۰۰)	۰/۵	۰/۵
	۴/۲	۴/۴

۴. مقایسه با کیت Roche Elecsys: برای بررسی همبستگی آماری بین کیت EIA پادتن علم و کیت Roche Elecsys ، غلظت TSH ۱۰۰۰ نمونه تصادفی با هر دو کیت اندازه گیری شد . مقایسه نتایج بدست آمده ضریب همبستگی ۰/۹۵ را نشان می دهد .

۵. دقت: شاخص دقت کیت با مقایسه تکرارپذیری جواب‌ها به روش میان سنجی (Inter-assay) و درون‌سنجی (Intra-assay) تعیین شده است. برای این منظور ۴ نمونه سرم ده بار در یک دوره آزمایش (درون‌سنجی) و یکبار در ده دوره آزمایش متفاوت (میان‌سنجی) تعیین غلظت شده است. نتایج انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات (CV) در جدول زیر آمده است.

جدول شاخص دقت

درون‌سنجی			میان‌سنجی		
٪CV	SD	µIU/ml میانگین	٪CV	SD	µIU/ml میانگین
۶/۴	۰/۲	۳/۶	۳/۲	۰/۱	۳/۳
۷/۳	۰/۶	۷/۵	۳/۲	۰/۲	۷/۲
۴/۷	۰/۶	۱۲/۴	۲/۸	۰/۳	۱۱/۶
۷/۲	۲/۵	۳۴/۵	۴/۱	۱/۲	۳۰/۳

۵. ریکاوری و رقت: ریکاوری به حالتی اطلاق می‌شود که با افزودن حجم معینی از یک محلول با غلظت بالا، به نمونه رقیق‌تر، افزایش غلظت حاصل شود. برای تعیین ریکاوری، محلولی با غلظت بالای TSH به نمونه سرمی که غلظت پائینی از TSH دارد، افزوده شده است. درصد ریکاوری طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$\frac{\text{غلظت اندازه‌گیری شده (µIU/ml)}}{\text{غلظت پیش‌بینی شده (µIU/ml)}} \times ۱۰۰$$

دامنه درصد ریکاوری به دست آمده از ۸۹/۴ تا ۱۰۲/۶ است.

جدول ریکاوری

ریکاوری ٪	غلظت اندازه‌گیری شده µIU/ml	غلظت پیش‌بینی شده µIU/ml	غلظت افزوده شده µIU/ml
–	۳/۲	–	–
۸۹/۴	۴/۲	۴/۷	۱/۵
۹۵/۱	۷/۸	۸/۲	۵/۰
۱۰۲/۶	۱۱/۸	۱۱/۵	۸/۳
۱۰۰/۶	۱۵/۷	۱۵/۶	۱۲/۴

برای بررسی خطی بودن رقتهای TSH بر روی منحنی چندین نمونه سرمی غلیظ، پس از رقیق شدن متوالی با استاندارد صفر، اندازه‌گیری شده و نتایج یک نمونه برای مثال در جدول زیر آورده شده است. دامنه درصد ریکاوری به دست آمده از ۱۰۲/۳ تا ۱۰۷/۹ است.

جدول رقت

ریکاوری ٪	غلظت اندازه‌گیری شده (µIU/ml)	غلظت پیش‌بینی شده (µIU/ml)	رقت
–	۶۰/۷	–	–
۱۰۲/۳	۳۱/۱	۳۰/۴	۱:۲
۱۰۶/۶	۱۶/۲	۱۵/۲	۱:۴
۱۰۷/۹	۸/۲	۷/۶	۱:۸
۱۰۵/۳	۴/۰	۳/۸	۱:۱۶

X. References

1. Chen IW, Heminger LA. Thyroid-stimulating hormone. In: Kaplan LA, Pesce AJ, eds. Clinical chemistry: theory, analysis, and correlation. 2nd edition. St. Louis: CV Mosby: 952-55, 1989.

2. Fernandez-Ulloa M, Maxon HR. Thyroid. In: Kaplan LA, Pesce AJ, eds. Clinical chemistry: theory, analysis, and correlation. 2nd edition. St. Louis: CV Mosby: 620-37, 1989.

3. Watts NB, Keffer JH. Practical endocrine diagnosis. Philadelphia: Lea and Febiger. 12-15: 77-90, 1982.

4. Chattoraj SC, Watts NB. Endocrinology. In: Tietz NW, ed. Fundamentals of clinical chemistry. 3rd edition. Philadelphia: WB Saunders: 550-551, 1987.

5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. How to define, determine, and utilize reference intervals in the clinical laboratory. Approved Guideline. NCCLS publication. 28: NCCLS, 1995.

احتیاط!

با توجه به اینکه محلول‌های به‌کار رفته در این کیت‌ها حاوی مواد سمی مانند تیمروزال و مواد پروتئینی با منشا انسانی و حیوانی هستند، و اینکه با هیچ تستی نمی توان از عدم وجود ویروس‌هایی چون HCV، HBV، HIV در این محلول‌ها اطمینان کامل حاصل کرد، خواهشمند است هنگام کار احتیاط های لازم از جمله استفاده از دستکش، امتناع از خوردن و آشامیدن و سیگار کشیدن، خودداری از پیپت کردن با دهان و پرهیز از هرگونه تماس محلول با چشم و دست‌ها، رعایت شود.

Rev: Jul.2020

تهران ۱۴۱۶۸، خیابان طالقانی غربی، خیابان شهید سرپرست (کیوان جنوبی)، پلاک ۲۶
تلفن و فکس: ۶۳۴۸۱(۰۲۱)