کیت ایمونو آنزیماتیک (EIA) پادتن علم

Neonatal TSH

☐ ۹۶ تستی ☐ ۱۹۲ تستی

موارد استفاده:
تعیین کمّی TSH نوزادان

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 T4 وT3 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 هورمون های T4 و T3 می‌شود[۱و۲].

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 مادرزادی نوزادان دیده می‌شود[۲و۳].

بر اساس آمار بین‌المللی، از هر ۳ تا ۷ هزار تولد، یک نوزاد مبتلا به این نوع هیپوتیروئیدی است که در صورت عدم درمان، نوزاد را دچار عقب افتادگی ذهنی و دیگر ناهنجاریهای مرتبط با آن می‌کند[۵-۷]. آمار منتشره در ایران و کشورهای منطقه از جمله ترکیه نیز مشابه آمار فوق‌الذکر است[۸-۹]. با استفاده از کیت تعیین کمّی TSH نوزادان پادتن علم، می‌توان نوزادان مبتلا به این نارسایی را شناسایی و سپس با درمان آنان از بروز اختلالات ذهنی و جسمی مرتبط جلوگیری کرد.

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 دایره‌هایی به قطر ۳ میلی‌متر که حاوی خون تام نوزادان، استانداردها و یا کنترل‌ها است را از لکه‌های خشک شده بر روی کاغذ صافی 903 شرکت Schleicher & Schuell جدا می‌کنند. سپس دایره‌ها درون حفره‌های پلی استایرن پوشیده شده با آنتی‌بادهای منوکلنال TSH قرار می‌گیرند. در انکوباسیون اول، TSH موجود در نمونه‌ها به آنتی بادی‌های ضد TSH متصل و بقیه مواد پس از تخلیه و شستشو از سیستم خارج می‌شوند. پس از شستشو، آنتی‌بادی دوم ضد TSH که به آنزیم پراکسیداز (HRP) متصل شده است به حفره‌ها افزوده می‌شود. بعد از دومین انکوباسیون و شستشو، با افزودن سوبسترایTMB(۳و´ ۳ – ۵ و´ ۵ تترامتیل بنزیدین) آنزیم رنگ آبی ایجاد می‌کند. 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-TN) درج شده است. دمای مناسب برای نگهداری کیت ۸-۲ درجه سانتی گراد می‌باشد.

محتویات کیت ۹۶ تستی

۱. **پلیت**: یک پلیت ۹۶ حفره‌ای پوشش داده شده با آنتی‌بادی‌های منو کلنال ضد TSH موش
۲. **استانداردها**: ۶ لکه خون خشک شده بر روی کاغذ صافی 903 حاوی TSH انسانی. غلظت دقیق TSH استانداردها که بر مبنای استاندارد سازمان بهداشت جهانی (2nd IRP 80/558) کالیبر شده‌اند در کنار لکه‌های خونی درج شده است. استانداردها بر مبنای غلظت خون تام (whole blood) کالیبر شده‌اند. غلظت TSH در سرم ۲/۲ برابر خون تام است.
۳. **کنترل‌های سرمی**: ۲ لکه خون خشک شده بر روی کاغذ صافی 903 حاوی TSH انسانی، غلظت دقیق TSH کنترل‌ها در کنار لکه‌های خونی درج شده است.
۴. **بافر حلال خون**: یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری محلول PBS، پروتئین و تیمروزال
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 ۲۵ میلی لیتری PBS-Tween 20 و تیمروزال.
۷. **محلول رنگ زا**: یک ویال ۱۲ میلی لیتری بافر H_2O_2 و TMB
۸. **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. **استانداردها**: ۶ لکه خون خشک شده بر روی کاغذ صافی 903 حاوی TSH انسانی. غلظت دقیق TSH استانداردها که بر مبنای استاندارد سازمان بهداشت جهانی (2nd IRP 80/558) کالیبره شده‌اند در کنار لکه‌های خونی درج شده است. استانداردها بر مبنای غلظت خون تام (whole blood) کالیبر شده‌اند. غلظت TSH در سرم ۲/۲ برابر خون تام است.
۳. **کنترل‌های سرمی**: ۲ لکه خون خشک شده بر روی کاغذ صافی 903 حاوی TSH انسانی، غلظت دقیق TSH کنترل‌ها در کنار لکه‌های خونی درج شده است.
۴. **بافر حلال خون**: یک ویال ۲۵ میلی‌لیتری محلول PBS، پروتئین و تیمروزال
۵. **ردیاب آنزیمی**: یک ویال ۱۲ میلی لیتری آنتی‌بادی ضد TSH متصل به پراکسیداز (HRP) محلول در بافر PBS، حاوی پروتئین و تیمروزال
۶. **محلول شستشوی غلیظ (۲۰X)**: یک ویال ۶۰ میلی لیتری PBS_Tween 20 و تیمروزال.
۷. **محلول رنگ زا**: دو ویال ۱۲ میلی لیتری بافر H_2O_2 و TMB
۸. **محلول متوقف کننده واکنش**: یک ویال ۲۵ میلی لیتریH_2SO_4 دو نرمال

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

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

V. جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها:

نمونه مناسب برای اندازه‌گیری TSH نوزاد ۲۴ تا ۷۲ ساعته، خون تام جذب شده بر روی کاغذ صافی 903 شرکت Schleicher & Schuell است. نحوه نمونه‌گیری توصیه شده طبق گزارش $NCCLS,LA_2-A_4$ به شرح زیر است:

- پاشنه پای نوزاد را با آب و صابون بشویید و خشک کنید. محل نمونه‌گیری با الکل ضدعفونی شود. Lancet را در پاشنه پا فرو برید، قطره اول را پاک کنید و قطره دوم خون را بر روی دایره نقش بسته بر روی کاغذ صافی 903 بنشانید. خون جذب شده باید تمام دایره را بپوشاند. کاغذ را به‌صورت افقی بر روی سطح تمیز قرار دهید تا در مجاورت هوا و دور از نور مستقیم آفتاب خشک شود.

بعد از ۳ ساعت لکه‌های خونی خشک شده، با رطوبت‌گیر در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شود.[۱۰]

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 دایره‌هایی به قطر ۳ میلی‌متر از لکه‌های خشک شده خون نوزادان، استانداردها و کنترل‌ها جدا کنید (با پانچ مخصوص) و در حفره‌ها بیاندازید.

۲. به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر بافر حلال خون اضافه کنید. سپس با تکان دادن پلیت، محتویات حفره‌ها را به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط نمائید.

۳. پلیت را ۲ ساعت در دمای اتاق (روی شیکر) یا ۱۵ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار دهید.

۴. حفره‌ها را پس از تخلیه محتویاتشان ۶ بار با ۴۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشوئید.

۵. در هر حفره ۵۰ میکرولیتر کونژوگه ضد TSH بریزید و یک ساعت روی شیکر در دمای اطاق قرار دهید.

۶. حفره‌ها را ۶ بار با ۴۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشوئید.

۷. به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای TMB اضافه کنید.

۸. پلیت را ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در محلی تاریک قرار دهید.

۹. ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده واکنش در هر حفره بریزید و به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط کنید.

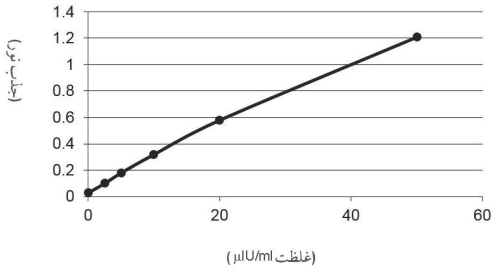
۱۰. میزان جذب نوری حفره‌ها را حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با طول موج دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) بخوانید.

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	۰/۰۳	استانداردA
۲/۵	۰/۱۰	استانداردB
۵	۰/۱۸	استانداردC
۱۰	۰/۳۲	استانداردD
۲۰	۰/۵۸	استانداردE
۵۰	۱/۲۱	استانداردF
۱۰/۳	۰/۳۳	لکه خون A

برای ترسیم منحنی از ارزش های مندرج بر روی برگه استانداردها استفاده کنید.



VIII. مقادیر طبیعی:

با استفاده از لکه‌های خون تام ۶۵۰ نوزاد، مقادیر طبیعی TSH نوزادان تعیین شده است. طبق نتایج به‌دست آمده با کیت TSH پادتن علم به روش EIA، غلظت TSH خون تام ٪۹۵ از نوزادان کمتر از ۵/۳ µIU/ml با میانگین ۰/۹ µIU/ml است. این نتایج با مقادیر طبیعی TSH خون تام نوزادان و کودکان (از کتاب های مرجع)[11] مطابقت دارد:

جدول مقادیر طبیعی TSH نوزادان و کودکان

سن نوزاد	غلظت TSH (µIU/ml) در خون تام
۶-۱ روز	<۶/۰
۴-۱ هفته	۰/۳-۴/۵
۱ ماه تا ۵ سال	۰/۲-۳/۲

توصیه می‌شود مراکز غربالگری بنا به دستورالعمل کشوری برای تفسیر نتایج خود ضمن در نظر گرفتن شرایط تولد نوزاد (سن، وزن، تولد زودرس، دوقلو یا چند قلو بودن و ...) غلظت ۵ µIU/ml را cut off منظور فرمایند.

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 µIU/ml ۰/۵ است.

۲. اختصاصی بودن: اختصاصی بودن تست TSH با اندازه گیری غلظت TSH بعد از افزودن مقادیربالایی از هورمون‌های LH (۲۵۰ mIU/ml)، FSH (۲۵۰ mIU/ml)، ßHCG (۵۰۰،۰۰۰ mIU/ml) بررسی شده است. نتایج این آزمایشات تداخلی در جدول زیر نشان داده شده است.

غلظت TSH (µIU/ml)		هورمون افزوده شده (mIU/ml
با هورمون افزوده شده	بدون هورمون افزوده شده	
۱	۱	LH(۲۵۰)
۱۰/۲	۱۰	
۱	۱	FSH(۲۵۰)
۱۰/۷	۱۰	
۱	۱	ßHCG(۵۰۰،۰۰۰)
۱۰/۵	۱۰	

۳. دقت: شاخص دقت کیت با مقایسه تکرار پذیری 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	میانگین µIU/ml	٪CV	SD	میانگین µIU/ml
۸/۸	۱/۶	۱۷/۷	۱۱/۳	۱/۷	۱۵/۰
۹/۸	۷/۶	۷۸/۴	۹/۰	۲/۴	۲۶/۵
۹/۱	۱۴/۹	۱۶۲/۴	۸/۸	۴/۸	۵۴/۹

۴. رقت: برای بررسی خطی بودن رقتهای TSH بر روی منحنی، چندین نمونه خون سیتراته (با غلظت TSH بالا) پس از رقیق شدن متوالی با نمونه خون سیتراته (با غلظت TSH پائین) روی کاغذ 903 نمونه‌گذاری شد، غلظت TSH نمونه‌ها اندازه‌گیری و نتایج یک نمونه برای مثال در جدول زیر آورده شده است. دامنه درصد ریکاوری به‌دست آمده مابین ۱۰۱/۲ تا ۱۱۹/۲ است.

جدول رقت

ریکاوری ٪	غلظت اندازه‌گیری شده (µIU/ml)	غلظت پیش‌بینی شده (µIU/ml)	رقت
–	۱۰۰/۵	–	–
۱۰۱/۲	۵۰/۸	۵۰/۲	۱:۲
۱۰۶/۷	۲۶/۸	۲۵/۱	۱:۴
۱۱۹/۲	۱۴/۳	۱۲/۰	۱:۸

۵. بررسی صحت جواب کیت TSH نوزادان: برای بررسی صحت جواب کیت TSH نوزادان، نتایج به‌دست آمده این کیت به دو روش مورد ارزیابی قرار گرفت.

الف- مقایسه نتایج با کیت TSH الکتروکمی لومینسانس شرکت Roche (با استفاده از سرم) :

برای بررسی صحت جواب کیت TSH نوزادان پادتن علم ، همبستگی آماری بین کیت TSH نوزادان پادتن علم و کیت Elecsys به روش الکترو کمی لومینسانس غلظت ۳۵۰ TSH لکه خونی (سن و جنس متفاوت) با غلظت TSH نمونه‌های سرمی مربوطه مقایسه شد. مقایسه نتایج به‌دست آمده ضریب همبستگی ۰/۹۷ را نشان می‌دهد.

ب- مقایسه نتایج با کیت TSH نوزادان (با استفاده از لکه‌های خونی):

برای بررسی همبستگی آماری بین کیت TSH نوزادان پادتن علم و کیت Autodelphi غلظت بیش از ۷۰ نمونه طبیعی و غیر طبیعی TSH لکه خونی با دو روش مقایسه گردید. ضریب همبستگی نتایج به‌دست آمده با هر دو کیت، بیش از ۰/۹۵ بوده است.

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. Spaulding S.W. and Utiger R.D. The Thyroid: Physiology, Hyperthyroidism, Hypothyroidism and the painful thyroid. "Endocrinology and Metabolism: P. Felig et. Al. (Ed.) McGraw Hill, 1981.

6. Committee of the American Thyroid Association, Recommendations For congenital hypothyroidism. M. Pediatr. 89:692-692, 1976.

7. Fisher, D.A. Neonatal Thyroid Screening. Pediatric Clinics of North America, 25: page 423, 1978.

8. Najafi A.R, et al. Evaluation of dried blood spot TSH-IRMA kit produced for the first time in the I.R.Iran. Im. J. Endocrinol. Metab. Vol 4, No 4, 2002.

9. Simsek E. et al. Neonatal screening for congenital hypothyroidism in West Black Sea area, Turkey. International Journal of Clinical Practic. 59: Page 336, 2004.

10. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Blood collection on filter paper for neonatal screening programs, approved standard, 3rd ed. NCCLS Document LA4-A3 .17:16,1997.

11. Soldin Sj, Brugnara C, Gunter KC, et al, eds, Pediatric Reference Ranges, 2nd ed, Washington, DC: AACC Press, page 139, 1997.

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 HIV، HBV، HCV 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)