کیت سنجش TSH به روش الایزا

مقدمه:

TSH هورمون گلیکوپروتئینی است با وزن ملکولی ۲۶۶۰۰ دالتون که از بخش قدامی غده هیپوفیز ترشح می شود و از دو زیر واحد آلفا و زیر واحد اختصاصی بتا تشکیل شده است ، زیر واحد آلفا شبیه زیر واحد آلفای هورمونهای گلیکو پروتئینی FSH , LH و hCG می باشد . ترشح TSH توسط هورمون آزاد کننده (TRH) تحریک می گردد که این هورمون آزاد کننده، خود از هیپوتالاموس ترشح می شود . TSH با اثر بر غده تیروئید باعث سنتز و ترشح هورمونهای تیروئیدی (شامل T3 و T4) می گردد . ترشح هورمون TSH توسط مقدار هورمونهای تیروئیدی آزاد در جریان خون بصورت فیدبک منفی تنظیم می گردد. سنجش میزان TSH جهت بررسی و تشخیص اختلالات غده تیروئید و همچنین بررسیهای محور هیپوتالاموسی- هیپوفیزی حائز اهمیت می باشد . کیت حاضر قابلیت اندازه گیری و تیتراسیون هورمون TSH را با اختصاصیت و حساسیت بسیار بالا دارا می باشد .

اساس آزمایش :

اساس این کیت به روش ساندویچ و با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال می باشد . در این روش چاهکها توسط آنتی بادیهایی علیه یک شاخص آنتی ژنیک زیر واحد بتای مولکول TSH پوشش داده می شوند (Coating). نمونه بیماران با آنتی بادی پوشش داده شده در ته چاهکها مجاور می شود، سپس آنتی بادی ثانویه ضد TSHمتصل به آنزیم HRP به چاهکها اضافه می شود . مقدار کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها با غلظت TSH در نمونه ها متناسب است . پس از شستشو محلول رنگزا که محتوی هیدروژن پراکسید (H2O2) وکروموژن است به داخل چاهکها ریخته می شود که رنگ آبی پدید آمده با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها متناسب است ، با افزودن محلول متوقف کننده ، رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد .

محتویات کیت :

۱) یک پلیت ۹۶ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد TSH (Anti- TSH Coated Plate) .
۲) محلول آنزیم کنژوگه (TSH Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۳) سری استانداردها (Standards Set) : شامل ۶ ویال استاندارد با غلظتهای TSH ۰، ۰/۵ ، ۲/۵ ، ۵ ، ۱۵ و ۳۰ mIU/L (استاندارد صفر حاوی ۲ میلی لیتر و سایر استانداردها حاوی ۱ میلی لیتر می باشند)، کالیبره شده در مقابل استانداردهای 80/558 2^{nd} WHO IRP.
۴) سرم کنترل(Control Serum) : یک ویال حاوی ۱ میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال .
۵) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۶) محلول شستشو (Wash Solution) : یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۲۰X) . جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف ، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید .
۷) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال حاوی ۱۲میلی لیتر .
۸) برچسب مخصوص پلیت .

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

۱) دستگاه الایزاریدر با طول موج ۴۵۰ نانومتر و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر .
۲) سمپلر های ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر دقیق .
۳) آب مقطر .

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

۱) محتویات این کیت برای مصرف در همین کیت تعبیه شده است .
۲) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید .
۳) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg و آنتی بادی های ضد HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند ، جهت احتیاط بهتر است هر آزمایشگری که با کیت کار می کند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزد .

شرایط نگهداری :

۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید .
۲) چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش چهارم – آبان ۹۲

۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضاء نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد .
۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۸-۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد .

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم یا پلاسما را می توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود، نمونه را می توان به مدت دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و یا برای مدت زمان طولانی تر (حداکثر تا ۳۰ روز) در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری نمود (در ضمن باید از Freeze-thaw نمودن نمونه پرهیز شود) .

توضیحات عمومی :

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق رسانده و بخوبی تکان دهید تا کاملاً یکنواخت شوند .
۲) بهتر است پس از شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند .
۳) از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید .
۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده ، جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .
۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند .
۶) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب زمان انکوباسیون مناسب می باشد ، بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب محلولهای مورد نیاز را باز کنید ، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث کسب نتایج دقیق تری می شود .
۷) به دلیل مشابه در بند ۶ بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه ها بیش از ۵ دقیقه بطول نیانجامد .

مراحل انجام آزمایش :

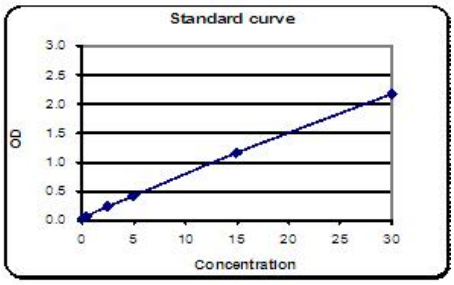
۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب نموده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .
۲) ۵۰ میکرولیتر از هر استاندارد، سرم کنترل و نمونه را به داخل هر چاهک بریزید، پیشنهاد می گردد که از استانداردها و نمونه ها بصورت داپلیکیت استفاده شود بدین معنی که هر استاندارد و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید .
۳) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) را به هر چاهک اضافه نموده و پلیت را به آرامی به مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات آن بخوبی مخلوط شوند .
۴) درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت ۶۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۸ – ۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید .
۵) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (برای شستشو می توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد، در هر بار شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو چاهکها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی محلول شستشو خارج شوند) .
۶) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) به هر چاهک اضافه نمایید .
۷) چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید .
۸) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید . برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزاریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نمایید . (توصیه می شود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد) .

محاسبه نتایج :

از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm میتوان استفاده نمود .
۱) جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید .
۲) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آنها نموداری (Point to point) رسم کنید به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آنها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی 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 بدست آورده و روی محور عمودی جای آن را پیدا کنید ، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید بطوریکه این خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و بعد از محل تلاقی خط و منحنی ، خطی عمود بر محور افقی وارد کنید نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com

استانداردها (mIU/L)	جذب نوری
۰	۰/۰۳
۰/۵	۰/۰۷
۲/۵	۰/۲۴
۵	۰/۴۲
۱۵	۱/۱۶
۳۰	۲/۱۷



توجه : جذبهای نوری و منحنی مربوطه فقط به عنوان نمونه می باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

مقادیر مورد انتظار :

مقادیر نرمال TSH در سرم افراد طبیعی که توسط تستهای مکرر به روش الایزا بدست آمده به قرار زیر می باشد ولی پیشنهاد می گردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد :

میانه محدوده طبیعی (mIU/L)	محدوده طبیعی در افراد بالغ (mIU/L)
۱/۸	۰/۳۲ – ۵/۲

شاخصهای اجرایی :

۱) حداقل مقدار قابل اندازه گیری :

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت TSH قابل تشخیص در این کیت 0.1 mIU/L می باشد .

۲) دقت آزمایش :

آزمایشهای اینترا- اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و اینتر- اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایشهای مختلف) با استفاده از ۳ سرم با غلظتهای مختلف TSH انجام گردید که در جداول ۱ و ۲ آمده است :

جدول شماره ۱ (اینترا- اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (mIU/L)	SD	CV%
۱	۱۶	۰/۲۵	۰/۰۱۵	۶
۲	۱۶	۴/۳۵	۰/۱۷	۳/۹
۳	۱۶	۱۱/۷	۰/۵۳	۴/۵

جدول شماره ۲ (اینتر- اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (mIU/L)	SD	CV%
۱	۲۰	۰/۲۵	۰/۰۲	۸
۲	۲۰	۴/۴	۰/۳۱	۷
۳	۲۰	۱۲/۱	۱/۰۲	۸/۴

* هر سری آزمایش بصورت Duplicate انجام شده است .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com

۳) ریکاوری آزمایش :

مقادیر معلومی از TSH به ۴ سرم با غلظتهای مشخص TSH افزوده شد و ریکاوری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول زیر آمده است :

نمونه	مقدار TSHموجود در سرم (mIU/L)	مقدار افزوده شده (mIU/L) TSH	مقدار مورد انتظار (mIU/L)	مقدار بدست آمده (mIU/L)	ریکاوری (%)
۱	۰/۶	۰/۵	۰/۵۵	۰/۶	۱۰۹
۱	۰/۶	۵	۲/۸	۲/۶	۹۳
۱	۰/۶	۱۵	۷/۸	۷/۵	۹۶
۲	۱/۸	۰/۵	۱/۱	۱/۱	۱۰۰
۲	۱/۸	۵	۳/۴	۳/۶	۱۰۶
۲	۱/۸	۱۵	۸/۴	۸/۸	۱۰۵
۳	۲/۹	۰/۵	۱/۷	۱/۶	۹۴
۳	۲/۹	۵	۳/۹	۴/۱	۱۰۵
۳	۲/۹	۱۵	۸/۹	۹	۱۰۱
۴	۵	۰/۵	۲/۷	۲/۵	۹۳
۴	۵	۵	۵	۴/۸	۹۶
۴	۵	۱۵	۱۰	۱۰/۵	۱۰۵

٤) خطی بودن آزمایش :

به کمک استاندارد صفر رقتهای متوالی ۴ نمونه سرم با غلظت مشخص از TSH تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت محاسبه شد که در جدول زیر نتایج آن آورده شده است :

نمونه	مقدار TSH موجود در سرم رقیق نشده (mIU/L)	ریکاوری (%)			
		رقت ۱/۲	رقت ۱/۴	رقت ۱/۸	رقت ۱/۱۶
۱	۲/۷	۱۰۰	۹۸	۱۰۲	۹۶
۲	۸/۴	۹۹	۱۰۳	۹۹	۹۶
۳	۱۶/۷	۹۹	۹۴	۱۰۴	۱۰۵
۴	۲۷/۸	۹۷	۱۰۵	۹۴	۸۵

0) اختصاصیت آزمایش :

اختصاصیت این آزمایش به کمک سرمهایی با غلظتهای مختلف hLH , hFSH و hCG جهت بررسی واکنشهای متقاطع با TSH بررسی شد که نتایج آن در جدول زیر آمده است .

جدول اختصاصیت (واکنش متقاطع) :

آنالیت	غلظت	غلظت ظاهری hTSH (mIU/L)
hFSH (IU/L)	۱۰۰۰ ۱۰۰ ۱۰	< ۰/۱
hLH (IU/L)	۱۰۰۰ ۱۰۰ ۱۰	< ۰/۱
hCG (IU/L)	۱۰۰۰۰۰ ۱۰۰۰۰ ۱۰۰۰	< ۰/۱

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱٤۹٤۷۳٤٤٦۳
تلفن ٤۲۱۹۷۰۰۰ فکس ٤۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com

٦) اثر هوک (Hook Effect) :

آزمایش TSH جهت سرمهایی با غلظت بسیار بالا از این آنالیت (تا ۵۰۰ mIU/L) صورت گرفت که پدیده هوک مشاهده نشد .

References:

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.

Helenius T., Tikanoja S.(1986) A sensitive and practical immunoradiometric assay of thyrotropin. Clin. Chem. 32 :514-518

Woodhead J.S., Weeks I. (1985) Circulating thyrotrophin as an index of thyroid function. Ann. Clin. Biochem. 22:455-459.

Lamberg B. A. , Helenius T., Liewendahl K. (1986) Assessment of thyroxine suppression in thyroid carcinoma patients with a sensitive immunoradiometric TSH assay. Clin . Endocrinol . 25:259-263.

روش انجام آزمایش TSHبصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی بادی ضد TSH			
محلولها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
استانداردها	۵۰ میکرولیتر	–	–
سرم کنترل	–	۵۰ میکرولیتر	–
نمونه	–	–	۵۰ میکرولیتر
آنزیم کنژوگه	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
پلیت را به ملایمت به مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهکها بخوبی مخلوط شوند و سپس دهانه چاهکها را با بر چسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید . برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید . طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید .			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید .			

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com