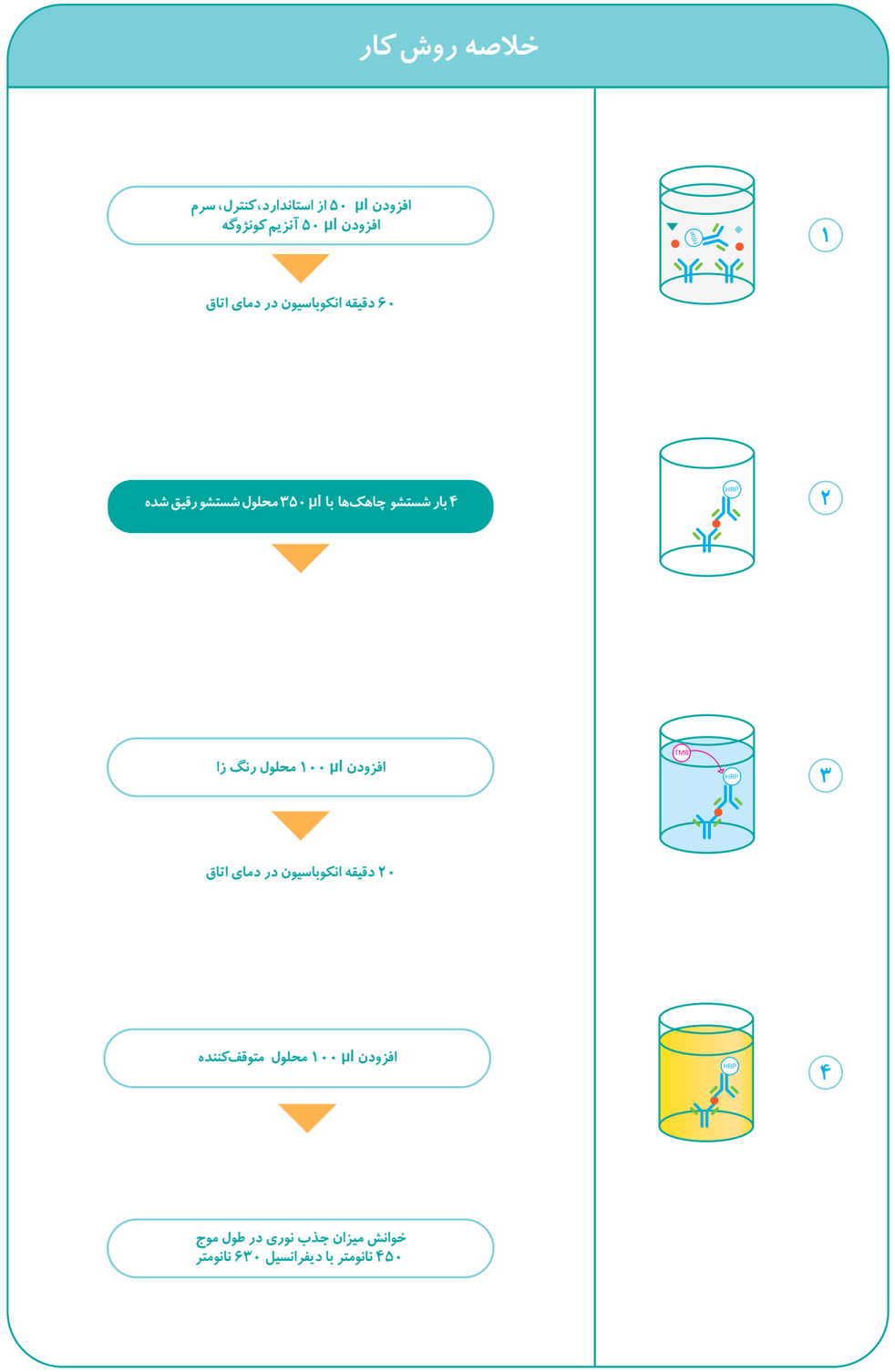
## خلاصه روش کار






## کاربرد

**اندازه‌گیری غلظت TSH در سرم یا پلاسمای انسانی به‌روش ایمونوآنزیماتیک**
(Cat.No. DG.TSH.01) **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

## مقدمه

**ساختار و نقش فیزیولوژیک:** تیروتروپین یا هورمون محرک تیروئید (Thyroid simulating hormone)، گلیگو پروتئینی با وزن مولکولی ۲۸ کیلو دالتون از دو زنجیره α و β ساخته شده است که با پیوندهای غیرکوالانسی به هم متصل شده اند. خصوصیات هورمونی و ایمونولوژیکی ویژه TSH توسط زیرواحد اختصاصی β ایجاد می شود. از لحاظ ساختار مولکولی زیر واحد آلفای TSH یازنجیره α هورمون های گیلیکوپروتئینی FSH (Follicle stimulating hormone)، hCG (Human chorionic gonadotropin)، LH (Luteinizing hormone) و شباهت دارد.[۱]

تولید و ترشح TSH از سلولهای بازوفیل بخش پیشین غده هیپوفیز با مکانیسم فیدبک منفی تحت کنترل هورمونهای تیروئیدی T4 و T3 آزاد در خون است. بطوریکه افزایش سطح سرمی آنها باعث کاهش ترشح هورمون آزاد کننده تیروتروپین (Thyrotropin releasing hormone) مترشحه از هیپوتالاموس شده و به تبع آن میزان TSH سرمی کاهش می یابد و بالعکس. علاوه بر TRH، دو هورمون سوماتواستاتین و دوپامین نیز که از هیپوتالاموس ترشح می شوند بر ترشح TSH اثرگذار هستند لیکن این دو تاثیر بازدارنده دارند.[۱،۲،۳]

وظیفه اصلی TSH تحریک رشد سلول های فولیکولی تیروئیدی و کنترل ترشح هورمون های T4 و T3 می باشد که از این طریق به صورت غیر مستقیم نقش اساسی در متابولیسم، تمایز و رشد سلولی بدن و فعالیت سیستم عصبی دارد.[۱،۳]

**کاربرد بالینی:** تعیین غلظت TSH در کنار هورمونهای مترشحه از غده تیروئید و یا اثر گذار بر آن، در تشخیص افتراقی بیماریهای تیروئیدی و تعیین انواع نارسایی های غدد تیروئید، هیپوفیز و هیپوتالاموس حائز اهمیت می باشد.[۴]

عمده بیماریهایی که باعث افزایش TSH سرمی می شوند عبارتند از کم کاری تیروئید نوع اول، هیپوتیروئیدی مادرزادی نوزادان، کم کاری تیروئیدی تحت بالینی، هاشیموتو، برداشتن غده تیروئید، رادیوتراپی، سندرم مقاومت به هورمون تیروئید و تومورهای ترشح کننده TSH (ماکرو آدنوما).

میزان هورمون TSH درموارد بیماریهای گریوز، آدنوم تیروئید سمی، گواتر مولتی ندولار سمی، تیروئیدیت گرانولوما یا نیمه حاد، پر کاری تیروئیدی تحت بالینی، غالب موارد کم کاری تیروئیدی ثانویه یا مرکزی کاهش می یابد[۵،۱].

## اساس روش سنجش

**مدت زمان انجام تست: ۶۰ دقیقه + ۲۰ دقیقه**

طراحی کیت TSH بر اساس روش ایمونوآنزیماتیک ساندویچی با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلنال می‌باشد. در این روش آنتی‌ژن مورد سنجش طی یک مرحله بین آنتی‌بادی تثبیت شده در ته چاهک‌های پلی‌استایرنی و آنتی‌بادی دوم متصل به آنزیم پراکسیداز (HRP) که شاخص‌های آنتی ژنیک متمایزی را روی مولکول TSH شناسایی می کنند، قرار می گیرد. پس از شستشو و خارج کردن آنالیت‌های غیرمتصل با افزودن سوبسترا، تترا متیل بنزیدین (TMB)، آنزیم رنگ آبی ایجاد می کند. با اضافه نمودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شود. شدت رنگ ایجاد شده که با غلظت TSH ارتباط مستقیم دارد، در طول موج **۴۵۰** نانومتر (با دیفرانسیل **۶۳۰** نانومتر) اندازه‌گیری می گردد.

## توجه و احتیاط

- این کیت تشخیصی به صورت *in vitro* قابل استفاده می‌باشد.
- کلیه محلول‌های کیت آماده مصرف هستند، فقط محلول شستشوی غلیظ (20x) قبل از استفاده نیاز به رقیق‌سازی دارد.
- اجزای اختصاصی این کیت برای مصرف با اجزای هم سری ساخت کیت ارائه شده‌اند.
- اجزای عمومی کیت شامل محلول‌های شستشو، رنگ زا و متوقف‌کننده می‌باشند که برای سایر محصولات دیازیست نیز قابل استفاده هستند.

**به‌منظور رقیق‌سازی نمونه می‌بایست از "محلول استاندارد صفر" کیت مربوطه، استفاده گردد.**

- جهت کاهش پدیده تأخیری، ضرورت دارد مرحله اول تست در کمتر از **۱۰** دقیقه انجام شود.
- توصیه می‌شود در هر تست استانداردها جهت رسم منحنی استفاده شوند، همچنین درصورتی که همزمان بیش از یک پلیت تست گذاشته شود، رسم منحنی برای هر پلیت ضروری است.
- کالیبره بودن ابزارها و دستگاه‌ها در صحت نتایج اثرگذار است.
- جهت ساخت اجزای این کیت از مواد شیمیایی و زیستی استفاده شده است. لذا توصیه می‌شود هنگام کار از تماس مستقیم با مواد پرهیز شود.

## محتویات کیت

**اجزای تشکیل دهنده کیت ۹۶و۱۹۲ تستی TSH به شرح زیر می باشد:**

| ردیف | نام اجزاء | مقدار/تعداد | بسته‌بندی |
|---|---|---|---|
| ۱ | پلیت پوشانده شده با آنتی‌بادی مونوکلنال ضد TSH (Anti- TSH Antibody Coated Microtiter Plate) | 1/96 wells | ۹۶تستی |
| | | 2/96 wells | ۱۹۲تستی |
| ۲ | استاندارد صفر (Standard A) | 1/4 ml | ۹۶تستی |
| | | 1/4 ml | ۱۹۲تستی |
| ۳ | استانداردهای B-G (Standards B-G) کالیبراسیون برمبنای استاندارد WHO (3th IS 81/565) | 6/1 ml | ۹۶تستی |
| | | 6/1 ml | ۱۹۲تستی |
| ۴ | کنترل پایین و بالا (Controls Low & High) کالیبراسیون برمبنای استاندارد WHO (3th IS 81/565) | 2/1 ml | ۹۶تستی |
| | | 2/1 ml | ۱۹۲تستی |
| ۵ | محلول شستشوی غلیظ (Concentrated Wash Buffer) | 1/25 ml | ۹۶تستی |
| | | 1/25 ml | ۱۹۲تستی |
| ۶ | محلول آنزیم (HRP) کونژوگه شده به آنتی بادی ضدTSH (Anti-TSH Antibody- HRP Conjugate) | 1/6 ml | ۹۶تستی |
| | | 1/12 ml | ۱۹۲تستی |
| ۷ | محلول رنگ زا (TMB Substrate) | 1/12 ml | ۹۶تستی |
| | | 1/25 ml | ۱۹۲تستی |
| ۸ | محلول متوقف‌کننده (Stop Solution) | 1/12 ml | ۹۶تستی |
| | | 1/25 ml | ۱۹۲تستی |

**شرایط نگهداری و پایداری**

- کیت را در دمای **۸-۲** درجه سانتیگراد نگهداری کنید.
- پایداری کیت در دمای **۸-۲** درجه سانتیگراد، قبل از شروع استفاده (In Shelf) و حین استفاده(In use) بر مبنای استاندارد CLSI ( EP25 -A) [۶] بررسی گردید که نتایج به شرح زیر می‌باشد:

| | |
|---|---|
| قبل از شروع استفاده (In Shelf) | تا پایان تاریخ انقضا |
| حین استفاده (In use) | تا ۶ ماه |

## جمع آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه مورد نیاز جهت اندازه‌گیری TSH، سرم یا پلاسمای به‌دست آمده با مواد ضد انعقاد هپارین، سیترات سدیم و EDTA می‌باشد. جهت پایداری نمونه‌ها از سدیم ازاید(Sodium Azide) استفاده نشود. نمونه ها در دمای **۸-۲** درجه سانتیگراد تا **۷** روز و در دمای **۲۰-** درجه سانتیگراد تا یک ماه قابل نگهداری هستند.[۷] از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه‌ها پرهیز نمایید. جهت اندازه‌گیری TSH نمونه‌های منجمد شده، ابتدا نمونه را در دمای اتاق ذوب و بعد با حرکت دست یکنواخت نمایید. در صورتی‌که غلظت نمونه‌ای بیش از آخرین استاندارد باشد، جهت اندازه‌گیری دقیق آنالیت، ابتدا نمونه را با **"محلول استاندارد صفر"** رقیق و نمونه رقیق شده را مجدد تست کنید. در محاسبه غلظت نهایی این نمونه ها، ضریب رقت را منظور نمایید.

### مواد و وسایل لازم که همراه کیت عرضه نمی شوند

- دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر **۴۵۰** و**۶۳۰** نانومتر کالیبر شده
- سمپلرهای **۱۰۰** و **۵۰** میکرولیتر کالیبر شده
- سرسمپلرهای یک‌بار مصرف
- آب مقطر برای رقیق سازی محلول شستشوی غلیظ

## روش انجام تست

### قبل از انجام تست:

- تمام مواد و نمونه ها را به دمای اتاق (**۲۵-۲۰** درجه سانتیگراد) برسانید.
- برای تهیه محلول شستشوی قابل مصرف، یک حجم محلول شستشوی غلیظ(20x) را با **۱۹** حجم آب مقطر رقیق نمایید.

## مراحل انجام تست :

۱. ۵۰ میکرولیتر از هر استاندارد، کنترل و نمونه سرم به چاهک مربوطه بریزید. سپس به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول آنزیم کونژوگه اضافه نموده و پلیت را روی میز تکان دهید تا به خوبی مخلوط شوند.

۲. روی چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پوشانده و مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.

۳. چاهک‌ها را ۴ بار با ۳۵۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.

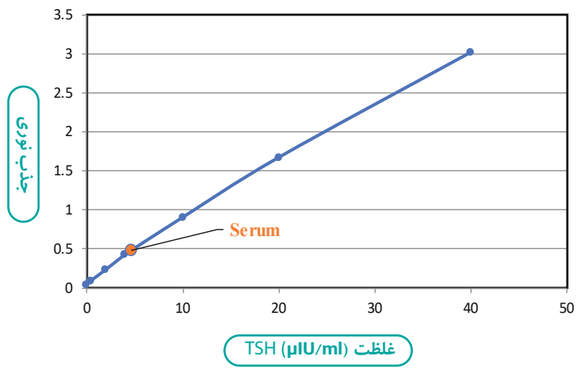
۴. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگ زا اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.

۵. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده اضافه نمایید و بعد از مخلوط کردن به مدت ۱۵ ثانیه، میزان جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر، حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، بخوانید.

## محاسبه نتایج

غلظت TSH نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد (رسم به‌صورت دستی یا دستگاه الایزا ریدر) تعیین می‌گردد. در این منحنی جذب نوری استانداردها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر بر روی محور عمودی (Y) و غلظت آن‌ها را بر حسب µIU/ml بر روی محور افقی (X) مشخص کنید و بر اساس آن منحنی را رسم نمایید. با استفاده از منحنی ترسیم شده و جذب نوری بدست آمده از نمونه، غلظت TSH آن قابل محاسبه می‌باشد. جدول و نمودار زیر به عنوان مثال ارائه شده است.

| نمونه | جذب نوری | میانگین جذب نوری | غلظت TSH (µIU/ml) |
|---|---|---|---|
| استاندارد A | ۰/۰۴۲ | ۰/۰۴۴ | ۰ |
| | ۰/۰۴۵ | | |
| استاندارد B | ۰/۰۸۳ | ۰/۰۹۰ | ۰/۴ |
| | ۰/۰۹۷ | | |
| استاندارد C | ۰/۲۲۹ | ۰/۲۳۶ | ۲ |
| | ۰/۲۴۲ | | |
| استاندارد D | ۰/۴۲۵ | ۰/۴۳۰ | ۴ |
| | ۰/۴۳۵ | | |
| استاندارد E | ۰/۹۰۳ | ۰/۹۰۶ | ۱۰ |
| | ۰/۹۰۹ | | |
| استاندارد F | ۱/۶۶۵ | ۱/۶۷۴ | ۲۰ |
| | ۱/۶۸۲ | | |
| استاندارد G | ۳/۰۳۸ | ۳/۰۲۲ | ۴۰ |
| | ۳/۰۰۶ | | |
| کنترل پایین | ۰/۰۸۶ | - | ۰/۳۷ |
| کنترل بالا | ۰/۸۹۱ | - | ۹/۸۱ |
| سرم | ۰/۴۷۸ | - | ۴/۶۰ |




## کنترل کیفی

**تست در صورتی تأیید می‌گردد که:**

- جذب نوری استاندارد صفر کمتر از ۰/۰۹ باشد.
- جذب نوری استاندارد آخر بیش از ۱/۴ باشد.
- خوانش کنترل‌های پایین و بالای کیت در محدوده مورد قبول باشد.
- توصیه می‌گردد جهت حصول اطمینان از نتایج کیت، علاوه بر کنترل‌های ارائه شده در کیت، به صورت دوره‌ای از کنترل‌های دقت و صحت تجاری نیز استفاده گردد. بدیهی است نتایج بدست آمده بایستی در محدوده مورد قبول قرائت گردد.

## تداخل‌ها و محدودیت‌ها

- جهت بررسی اختصاصیت آنتی بادی به کار رفته در این کیت، اثر تداخلی آنالیتهای هورمونی FSH (تا ۵۰۰ mIU/ml)، LH (تا ۵۰۰ mIU/ml) و hCG (تا ۲۰۰,۰۰۰ mIU/ml) بررسی گردید. نتایج در جدول زیر آمده است.

| درصد تداخل (Cross-reactivity) | ماده افزوده شده |
|---|---|
| <۰/۱ | FSH |
| <۰/۱ | LH |
| <۰/۱ | hCG |

- اثر تداخلی بیلی روبین (تا ۲۰ mg/dl)، هموگلوبین (تا ۵۰۰ mg/dl)، تری گلیسیرید (تا ۳۰۰۰ mg/dl) و فاکتورهای روماتوئید(تا ۳۲۵۰ IU/ml) در سرم کمتر از ۵٪ می باشد.
- در این کیت برای نمونه‌های رقیق نشده تا غلظت (تا ۱۰۰۰ µIU/ml) اثر هوک دیده نشد.
- نمونه سرم یا پلاسمای افرادی که سابقه درمان یا تشخیص بیماری با مواد حاوی آنتی‌بادی مونوکلنال موش داشته‌اند، می‌تواند حاوی آنتی بادی‌های انسانی ضد موش (HAMA) باشد. با توجه به غلظت آنتی‌بادی و مواد بازدارنده مورد استفاده در این کیت، واکنش‌های تداخلی غیر اختصاصی به حداقل رسیده و تا کنون واکنش مثبت کاذب مشاهده نشده است.
- محدوده قابل اندازه‌گیری غلظت TSH با این کیت تا ۴۰ µIU/ml – ۰/۱ می‌باشد.

## مقادیر طبیعی

دامنه مقادیر طبیعی با اندازه گیری غلظت سرمی TSH، ۲۸۰ فرد بالغ سالم (euthyroid) تعیین گردید. بنا به نتایج بدست آمده غلظت سرمی TSH این افراد در محدوده ۵/۴۵ µIU/ml - ۰/۳۲ با میانگین ۲/۴۵ µIU/ml می باشد.

قابل ذکر است که اعداد فوق یک راهنمای کلی است و توصیه می‌گردد هر آزمایشگاه با اندازه‌گیری غلظت TSH افراد سالم، مقادیر طبیعی مرجع خود را تعیین و از آن برای تفسیر نتایج استفاده نماید.

## ویژگی‌های اختصاصی کیت

**۱. حساسیت:** حداقل غلظت قابل اندازه گیری TSH که از نمونه فاقد آنالیت قابل تمایز باشد را حساسیت گویند. این مقدار که بر اساس میانگین غلظت استاندارد صفر بعلاوه دو برابر انحراف معیار محاسبه گردیده است (**بدست آمده از ۱۰ تست**)، ۰/۱ µIU/ml می‌باشد.

**۲. صحت:** غلظت سرمی TSH ۳۷۵ نمونه تصادفی با کیت دیازیست و روش مرجع (ELFA) اندازه‌گیری شد. نتایج بدست‌آمده از مقایسه دو روش ضریب همبستگی خطی (r) ۰/۹۷ را نشان می‌دهد. غلظت نمونه ها با کیت دیازیست بین ۰/۱۱ µIU/ml تا ۳۹/۵ و با روش مرجع بین ۰/۱۱ µIU/ml تا ۳۹/۲ بود. نتایج مقایسه دو روش به شرح زیر است:

| روش | تعداد نمونه | غلظت نمونه‌ها (µIU/ml) | Intercept | Slope |
|---|---|---|---|---|
| Passing/Bablok | ۳۷۵ | ۰/۱-۴۰ | -۰/۰۱ | ۱/۰۱ |
| Linear Regression | ۳۷۵ | ۰/۱-۴۰ | ۰/۰۳ | ۱/۰۰ |



**۳. دقت:** شاخص دقت این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP5-A2) [۸] ارزیابی گردیده است. بدین منظور میزان TSH ۳ نمونه سرمی با غلظت‌های مختلف اندازه‌گیری و انحراف معیار و ضریب تغییرات محاسبه گردید که در جدول زیر آمده است:

| شماره نمونه | تعداد سنجش | میانگین غلظت (µIU/ml) | Within Run | | Total | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | SD | ٪CV | SD | ٪CV |
| ۱ | ۶۰ | ۰/۷۸ | ۰/۰۳ | ۳/۳۵ | ۰/۰۳ | ۳/۵۷ |
| ۲ | ۶۰ | ۵/۰۱ | ۰/۱۶ | ۳/۲۰ | ۰/۲۰ | ۳/۹۴ |
| ۳ | ۶۰ | ۱۴/۲۳ | ۰/۳۹ | ۲/۷۲ | ۰/۳۹ | ۲/۷۷ |

**۴. خطی بودن:** به منظور بررسی صحت اندازه‌گیری نمونه‌های با غلظت بالای ULoQ (upper limit of quantitation) تست خطی بودن این کیت بر مبنای استاندارد CLSI(EP34)[۹] انجام گردید. بدین منظور نمونه سرم با غلظت ۲۲/۷۰ µIU/ml با "نمونه فاقد آنالیت" به صورت متوالی رقیق شد سپس غلظت‌ها با کیت TSH اندازه‌گیری گردید. درصد ریکاوری رقت که شاخص میزان دقت رقت‌گیری می باشد، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

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

(محدوده درصد ریکاوری بدست آمده بین ۹۶/۷ تا ۱۰۴/۲ است)

| ٪ ریکاوری | غلظت اندازه‌گیری شده (µIU/ml) | غلظت مورد انتظار (µIU/ml) | رقت |
|---|---|---|---|
| ۹۶/۷ | ۱۰/۹۹ | ۱۱/۳۵ | ۱:۲ |
| ۱۰۳/۵ | ۵/۸۸ | ۵/۶۸ | ۱:۴ |
| ۹۷/۵ | ۲/۷۷ | ۲/۸۴ | ۱:۸ |
| ۱۰۴/۲ | ۱/۴۹ | ۱/۴۲ | ۱:۱۶ |

**۵. بازیابی:** به‌منظور بررسی اثر ماتریکس، تست بازیابی این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP34)[۹] انجام گردید. بدین منظور مقادیر متفاوتی از نمونه حاوی TSH با غلظت بالا (۲۵/۶۰µIU/ml) به نمونه مورد بررسی حاوی TSH با غلظت پایین (۲/۷۰µIU/ml) افزوده شد. سپس غلظت نمونه‌ها با کیت TSH اندازه‌گیری گردید و درصد ریکاوری که شاخص میزان دقت بازیابی می‌باشد، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\frac{a-b}{c} \times 100$$

a: غلظت اندازه‌گیری‌شده نمونه مورد بررسی بعد از افزودن آنالیت

b: غلظت اندازه‌گیری‌شده نمونه مورد بررسی بعد از افزودن محلول رقیق‌کننده

C: غلظت آنالیت افزوده شده

(درصد ریکاوری بدست آمده بین ۹۵/۱ تا ۱۰۲/۶ است)

| ٪ ریکاوری | c (µIU/ml) | b (µIU/ml) | a (µIU/ml) |
|---|---|---|---|
| ۹۵/۱ | ۱/۲۲ | ۲/۶۷ | ۳/۸۳ |
| ۱۰۲/۶ | ۲/۳۳ | ۲/۸۰ | ۵/۱۹ |
| ۱۰۰/۲ | ۴/۲۷ | ۲/۳۴ | ۶/۶۲ |
| ۹۶/۶ | ۷/۳۱ | ۲/۷۸ | ۹/۸۴ |

## منابع

1. Roelfsema F, Veldhuis J.D. Thyrotropin Secretion Patterns in Health and Disease. Endocrine Reviews, April 10, 2013.
2. Nikrodhanond A. A. and *et.al*. Dominant role of thyrotropin-releasing hormone in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, December 8, 2005.
3. Kim HY., Mohan S. Role and Mechanisms of Actions of Thyroid Hormone on the Skeletal Development. Bone Research.2: 146-61, 2013.
4. Visser T.J. Oxford Textbook of Endocrinology and Diabetes. Chapter:Biosynthesis, transport, metabolism, and actions of thyroid hormones, Second edition, 2011.
5. Epocrates. Thyroid function testing, 2018.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Stability of *In Vitro* Diagnostic Reagents; Approved Guideline – First Edition. NCCLS Document EP25-A. 2009.
7. Wu AHB. Tietz Clinical Guide To Laboratory Tests. Saunders, Philadelphia 3rd edition, p. 594, 1995.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline – Second Edition. NCCLS Document EP5-A2. 2004.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Establishing and Verifying an Extended Measuring Interval Through Specimen Dilution and Spiking – First Edition. EP34. 2018.

تهران،خیابان سهروردی شمالی،خیابان افشار جوان،پلاک ۲، واحد ۱۰
تلفن ویژه: ۰۲۱-۷۲۴۵۷
office@garnimed.com
www.garnimed.com

Published: Dec. 2018