

اهمیت بالینی

هورمون تحریک کننده تیروئید (TSH) با ساختار گلیکوپروتئینی توسط لوپ قدامی غده هیپوفیز ترشح می شود و مسئول تنظیم ترشح هورمون های T3 و T4 توسط غده تیروئید است. ترشح TSH توسط هورمون آزاد کننده (TRH) تنظیم می شود. سطح TSH و TRH با سطح هورمون تیروئید رابطه معکوس دارند. هنگامی که سطح بالایی از هورمون تیروئید در خون وجود دارد، TRH کمتری توسط هیپوتالاموس ترشح می شود، بنابراین TSH کمتری از هیپوفیز آزاد می گردد. هنگامی که هورمون تیروئید در خون کاهش می یابد، عمل عکس آن رخ می دهد. اگرچه غلظت TSH در خون بسیار کم است؛ اما برای حفظ عملکرد طبیعی تیروئید ضروری است. تعیین سطح سرمی TSH به عنوان یک روش حساس در تشخیص اختلالات تیروئید شناخته شده است. حیطة کاربرد این کیت اندازه گیری کمی غلظت TSH در سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش

اساس آزمایش در این کیت به روش الایزای ساندویچ بوده و کمپلکسی بین آنتی بادی بیوتینیل، آنتی بادی متصل به آنزیم HRP و سرم حاوی آنتی ژن، تشکیل شده که اتصال این کمپلکس به سطح چاهک بدلیل میل اتصال بالای بیوتین به استرپتاویدین تثبیت شده در سطح چاهک انجام می گیرد. پس از انجام شستشو و افزودن محلول سوبسترای آنزیم HRP به چاهک ها، رنگ آبی تشکیل شده که با افزودن محلول متوقف کننده تبدیل به رنگ زرد

می گردد که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بهترین جذب نوری را دارد. مقدار کمپلکس تشکیل شده در مراحل اولیه و شدت رنگ بوجود آمده با غلظت TSH موجود در نمونه سرم متناسب است.

محتویات کیت

۱) کالیبراتورها (Calibrators):

شامل ۶ ویال کالیبراتور با غلظت های ۰، ۰/۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۵ (μIU/mL).

نکته: کالیبراتورها بر پایه سرم انسانی تهیه شده اند.

۲) محلول کونژوگه آنزیمی (TSH Enzyme Conjugate)

۱۱ میلی لیتر:

دو ویال شامل محلول آنتی بادی نشان دار شده با آنزیم و آنتی بادی بیوتینیل شده.

۳) پلیت استرپتاویدین ۹۶ تستی:

دو پلیت حاوی استرپتاویدین تثبیت شده که به همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی بسته بندی شده است.

۴) محلول شستشو غلیظ (Wash Buffer-50X)

میلی لیتر:

یک ویال شامل سورفاکتانت محلول شده در بافر فسفات.

۵) محلول سوبسترای A (Substrate Solution A)

میلی لیتر:

دو ویال محلول تترا متیل بنزیدین (TMB).

۶) محلول سوبسترای B (Substrate Solution B)

میلی لیتر:

دو ویال محلول هیدروژن پراکساید (H2O2).

۷) محلول متوقف کننده (Stop Solution)

یک ویال حاوی محلول متوقف کننده واکنش.

۸) سرم کنترل (TSH Control):

ویال (های) حاوی ۰/۵ میلی لیتر سرم کنترل.

۹) برچسب مخصوص پلیت:

دو ورق.

موارد احتیاط در استفاده از کیت

- این کیت برای انجام تست های تشخیصی در محیط های آزمایشگاهی کاربرد دارد. محتویات کیت منشاء سرم انسانی داشته و از نظر عدم وجود HBsAg و آنتی بادی های ضد HIV1/2 و HCV کنترل شده اند، اما از آنجا که هیچ روشی به طور صد درصد نمی تواند منفی بودن این موارد را تأیید نماید، بنابراین لازم است هنگام استفاده از کیت، مراقبت های لازم را به عمل آورده شود.
- محتویات تعبیه شده در این کیت برای استفاده در همین سری ساخت بوده و از استفاده مشترک با سایر سری ساخت ها خودداری فرمایید.

- برای دریافت نتایج بهتر و دقیق تر فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ چاهک ها رعایت شود، این فاصله زمانی نباید به گونه ای باشد که منجر به اثر دررفت (drift) گردد. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل این نکته حائز اهمیت است. دقت نمایید محلول ها نزدیک به ته چاهک ریخته شوند.

- شستشوی نامناسب می تواند باعث بوجود آمدن نتایج اشتباه در آزمایش شود.
- کلیه محلول ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از استفاده از محلول هایی که تاریخ انقضاء آن ها گذشته است خودداری نمایید.

جمع آوری و تهیه نمونه ها

- نمونه مورد استفاده در این آزمایش سرم انسانی می باشد که از خون سیاهرگی تهیه شده و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول های خونی جدا می گردد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه گیری در درستی نتایج به دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. حتی الامکان از نمونه های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
- نگهداری سرم باید در لوله های در بسته انجام شود. نمونه ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و در صورت استفاده برای مدت زمان طولانی تر (حداکثر تا ۳۰ روز) در دمای ۲۰- سانتی گراد نگهداری شوند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه ها خودداری کنید.
- در افرادی که دوز بالایی از بیوتین (>5 mg/day) را دریافت می کنند، نمونه گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.

آماده سازی و نگهداری محلول ها

محلول شستشو: کل حجم ویال محلول شستشو (50X) را با ۹۸۰ میلی لیتر آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر برسانید. محلول آماده شده در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.

محلول سوبسترا: قبل از شروع استفاده از کیت، کل حجم محلول رنگزا B (ویال روشن) را داخل محلول رنگزا A (ویال تیره) خالی نمایید و برای انجام تست تا پایان مصرف کیت استفاده نمایید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

مراحل انجام تست

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی گراد) رسیده اند. کلیه ویال های کالیبراتور، کنترل و نمونه ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت نمایید.

۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام آزمایش را جدا نموده و چاهک های باقی مانده به همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده، درب آن را ببندید و در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه های بیمار و یا کنترل را در داخل چاهک های مورد نظر بریزید. پیشنهاد می شود که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک ها ریخته شود و از میانگین جذب نوری آنها استفاده نمایید.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به تمامی چاهک ها اضافه نمایید. پلیت را ۳۰-۲۰ ثانیه به آرامی روی سطح میز تکان دهید.

۴) پلیت را با برچسب بیوشانید و بمدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک ها را در روش دستی با وارونه کردن پلیت و در روش دستگاهی با آسپیره کردن کاملاً تخلیه نمایید.

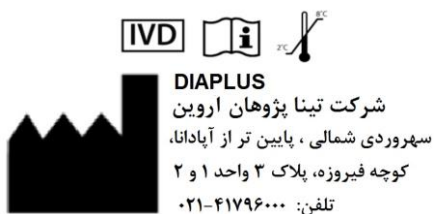
۶) چاهک ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده سازی محلول ها را مطالعه فرمایید) بشوید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت گیر بزنید.

منابع

1. Barker, S.B., "Determination of Protein Bound Iodine." *Journal Biological Chemistry*, 173, 175, (1948).
2. Chopra, I.J., Solomon, D.H., an Ho, R.S., "A Radioimmunoassay of Thyrotropin," *J. Clinical Endocrinol*, **33**, 865 (1971).
3. Young, D.S., Pestaner, L.C., and Gilberman, U., "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests." *Clinical Chemistry*, 21, 3660 (1975).
4. Spencer, CA, et al., "Clinical Chemistry, Interlaboratory/Intermethod differences in Functional Sensitivity of Immunometric Assays of Thyrotropin (TSH) and Impact on Reliability of Measurement of Subnormal Concentrations of TSH", 41, 367 (1995).

در صورت بروز هرگونه مشکل با بخش پشتیبانی شرکت تینا پژوهان آروین تماس حاصل فرمایید.

توجه: چنانچه از دستگاه‌های الیزا پروسسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.



Cross Reactivity

اختصاصیت این آزمایش با اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مداخله‌گر به سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین دوز ماده مداخله‌گر به دوز TSH مورد نیاز برای همان مقدار جذب ارزیابی شد.

Analyte	Cross Reactivity	Concentration
hTSH	1	
hFSH	<0.0001	1000 ng/mL
hLH	<0.0001	1000 ng/mL
HCG	<0.0001	1000 ng/mL

Sensitivity

بر اساس جمع میانگین جذب نوری کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف معیار حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت $0.1 \mu\text{IU/mL}$ می‌باشد.

Stability

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی نتایج به‌صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

پارامترهای کنترل کیفی

Intra – Assay

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean TSH ($\mu\text{IU/mL}$)	0.89	4.8	8.9
SD ($\mu\text{IU/mL}$)	0.05	0.21	0.35
C.V (%)	5.6	4.3	3.9

Inter – Assay

دقت بین‌تستی با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با غلظت‌های متفاوت در چهار نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean TSH ($\mu\text{IU/mL}$)	0.77	5.4	7.6
SD ($\mu\text{IU/mL}$)	0.05	0.30	0.41
C.V (%)	6.4	5.5	5.3

Recovery

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و سطح TSH در ترکیب به‌دست آمده اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش، $Bias < 10\%$ نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample ($\mu\text{IU/mL}$)	Added ($\mu\text{IU/mL}$)	Exp. ($\mu\text{IU/mL}$)	Obs. ($\mu\text{IU/mL}$)	% Rec
1	7.31	0.88	4.09	4.19	102.4
2	4.32	7.95	6.13	6.01	98
3	0.93	3.34	2.13	2.19	102.8

Linearity

در این تست، غلظت TSH در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش، $Bias < 10\%$ است.

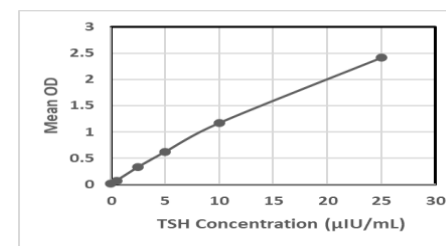
No.	Sample ($\mu\text{IU/mL}$)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	1.6	-1.6	-2.7	1.8	2.3
2	5.7	2.2	-1.9	-2.1	3.3
3	9.3	-2.8	-3.4	-1.9	-1.5

(۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا آماده شده (بخش آماده‌سازی محلول‌ها را مطالعه بفرمایید) به چاهک‌ها اضافه نمایید و با برچسب پلیت بپوشانید. سپس پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری فرمایید.

(۸) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به چاهک‌ها اضافه نموده و به مدت ۲۰-۱۵ ثانیه به‌آرامی تکان دهید.

(۹) جذب نوری چاهک‌ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از روش Point to Point و حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج فرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrators Number	Well Number	Abs	Mean Abs	Conc. ($\mu\text{IU/mL}$)
Cal. A	A1	0.011	0.015	0
	B1	0.019		
Cal. B	C1	0.067	0.069	0.5
	D1	0.071		
Cal. C	E1	0.323	0.328	2.5
	F1	0.333		
Cal. D	G1	0.615	0.617	5
	H1	0.620		
Cal. E	A2	1.154	1.168	10
	B2	1.182		
Cal. F	C2	2.408	2.414	25
	D2	2.421		



نکته: جذب نوری به‌دست آمده از کالیبراتورها و همچنین منحنی فوق فقط به‌عنوان مثال ذکر شده و در هر آزمایشگاهی در هر مرتبه آزمایش باید منحنی جدیدی ترسیم گردد.

مقادیر مورد انتظار

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر برای آنالیت مورد نظر باید توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

Normal Range For Adults
0.4 - 5 ($\mu\text{IU/mL}$)