

کیت سنجش TSH به روش الایزا

حیطه کاربرد:

کیت الایزای TSH پیشتازتپ به منظور اندازه‌گیری کمی هورمون محرک تیروئید (TSH) در سرم انسان طراحی شده است. این کیت به عنوان یک ابزار کمک تشخیصی در بررسی و ارزیابی اختلالات عملکرد تیروئید، شامل کم کاری و پرکاری تیروئید، و همچنین بررسی محور هیپوتالاموسی-هیپوفیزی به کار می‌رود. نتایج این کیت باید همراه با یافته‌های بالینی و سایر روش‌های تشخیصی تفسیر شود. محتوای این کیت تنها برای استفاده آزمایشگاهی است.

مقدمه:

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

اساس آزمایش:

اساس این کیت به روش الایزای ساندویچ و با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال می‌باشد. در این روش چاهک‌ها توسط آنتی‌بادی‌هایی علیه یک شاخص آنتی ژنیک زیر واحد بتای مولکول TSH پوشش (Coating) داده می‌شوند. نمونه بیماران با آنتی‌بادی پوشش داده شده در ته چاهک‌ها مجاور می‌شود، سپس آنتی‌بادی ثانویه ضد TSH متصل به آنزیم HRP به چاهک‌ها اضافه می‌شود. مقدار کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهک‌ها با غلظت TSH در نمونه‌ها متناسب است. پس از شستشو، محلول رنگ‌زا که محتوی هیدروژن پراکسید (H₂O₂) و کروموزن است به داخل چاهک‌ها ریخته می‌شود که رنگ آبی پدید آمده، با میزان کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهک‌ها متناسب است. با افزودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شود که بهترین جذب نوری را در طول موج 450nm دارد.

محتویات کیت:

- ۱) پلیت خانه حاوی چاهک‌های پوشش داده شده با آنتی‌بادی ضد TSH (Anti-TSH Coated Plate).
- ۲) محلول آنزیم کونژوگ (Enzyme Conjugate): ویال حاوی محلول آنتی‌بادی Anti-TSH کونژوگه شده با آنزیم HRP (آماده برای مصرف).
- ۳) سری استاندارد (Standard Set): ۶ ویال استاندارد شامل غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۲/۵، ۵، ۱۵ و ۳۰ mIU/L از TSH، کالیبره شده در مقابل استاندارد WHO IRP 2nd 80/558.
- ۴) سرم کنترل (Control Serum): ویال حاوی سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال.
- ۵) محلول شستشو (Wash Solution): ویال حاوی محلول شستشوی غلیظ (20X)، به منظور تهیه محلول شستشوی آماده مصرف مقدار لازم از محلول شستشوی غلیظ را به نسبت ۱:۲۰ با آب مقطر رقیق کنید.
- ۶) محلول رنگ‌زای یک مرحله‌ای (Chromogen-Substrate): ویال حاوی تترامیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده مصرف).
- ۷) محلول متوقف کننده (Stop Solution): ویال حاوی اسید کلریدریک ۱ نرمال.
- ۸) برچسب مخصوص پلیت.
- ۹) دفترچه راهنمای محصول.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند:

- ۱) دستگاه الایزا ریدر (ELISA Reader) دارای فیلتر 450 nm (و در صورت امکان 630 nm به عنوان فیلتر فرانس).
- ۲) سمپله‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری دقیق.
- ۳) آب مقطر.

نکات قابل ذکر برای مصرف‌کنندگان:

- ۱) محتویات این کیت فقط برای مصرف در همین کیت می‌باشد.
- 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 HBs Ag و آنتی‌بادی‌های ضد HCV و HIV کنترل گردیده‌اند و فاقد این عوامل می‌باشند. برای احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می‌کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند.
- ۴) نمونه بیماران، استانداردها، کنترل‌ها و چاهک‌های استفاده شده، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند. تمامی محلول‌های واکنش‌گر و معرف‌ها باید مطابق با مقررات ملی دفع پسماندهای عفونی امحا شوند.

شرایط نگهداری:

- ۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.
- ۲) چاهک‌ها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نم‌گیر نگهداری نمایید.
- ۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آن‌ها می‌باشد.
- ۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱:۲۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و مصرف می‌باشد.

جمع‌آوری و آماده سازی نمونه:

سرم یا پلاسما را می‌توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود، نمونه می‌تواند برای مدت دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و یا برای مدت طولانی‌تر (حداکثر تا ۳۰ روز) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شود. در ضمن باید از ذوب و انجماد نمودن نمونه پرهیز شود. از نمونه‌های مشکوک به آلودگی میکروبی برای انجام آزمایش استفاده نشود.

توضیحات عمومی:

- ۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه‌ها را به دمای اتاق برسانید.
- ۲) بهتر است به محض 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 متوقف‌کننده، جذب نوری چاهک‌ها حداکثر تا نیم ساعت قابل اندازه‌گیری می‌باشد.
- ۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهک‌ها به صورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهک‌ها تخلیه شوند.
- ۶) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب، زمان انکوباسیون مناسب می‌باشد، بنابراین پیشنهاد می‌گردد 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 نتایج دقیق‌تر می‌شود.
- ۷) به دلیل مشابه در بند ۶ بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه‌ها بیش از ۵ دقیقه به طول نیانجامد.
- ۸) شستشوی صحیح با مقدار مناسب بافر شستشو جهت حصول نتایج قابل اعتماد بسیار ضروری است.

مراحل انجام آزمایش:

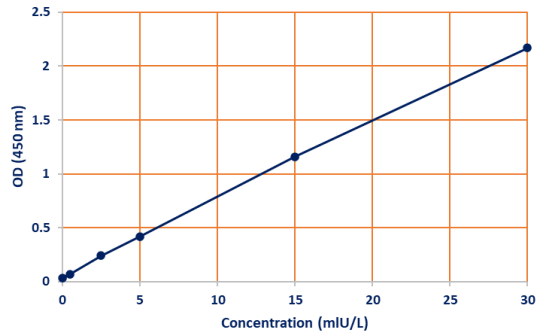
- ۱) تعداد چاهک‌های مورد نظر را انتخاب نموده و سایر چاهک‌ها را به همراه نم‌گیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید.
- ۲) ۵۰ میکرولیتر از هر استاندارد، سرم کنترل و نمونه را به داخل هر چاهک بریزید. پیشنهاد می‌گردد استانداردها و نمونه‌ها به صورت دویپلیکیت (Duplicate) استفاده شوند؛ به این معنی که هر استاندارد و نمونه در دو چاهک قرار گیرد و در نهایت از میانگین جذب نوری آن‌ها برای محاسبه نتایج استفاده شود.
- ۳) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه (Enzyme Conjugate) را به هر چاهک اضافه نموده و پلیت را به آرامی به مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات آن به خوبی مخلوط شوند.
- ۴) درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهک‌ها را به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۸ - ۲۲ درجه سانتی‌گراد) انکوبه نمایید.
- ۵) محتویات چاهک‌ها را خالی کرده و چاهک‌ها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (برای شستشو می‌توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می‌تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد. در هر بار شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک‌ها 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 متوقف‌کننده (Stop Solution) به هر چاهک، ادامه واکنش‌های آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزا ریدر با فیلتر 450 nm استفاده نمایید (توصیه می‌شود از فیلتر 630 nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد).

محاسبه نتایج:

از هر دستگاه الایزا ریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج 450 nm می‌توان استفاده نمود.

- ۱) جذب نوری استانداردها و نمونه‌ها را به کمک دستگاه الایزا ریدر در طول موج 450 nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس 630 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 استاندارد 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 به طوری که 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. (برای این کار می‌توانید از **محاسبه‌گر خودکار پیش‌تاز طب** استفاده کنید.)

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 می‌باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

مقادیر مورد انتظار:

مقادیر نرمال TSH در سرم افراد سالم که توسط تست‌های مکرر به روش الایزا بدست آمده به قرار زیر می‌باشد ولی پیشنهاد می‌گردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد:

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

محدودیت روش اندازه‌گیری:

با وجود استفاده از مواد بلاک‌کننده آنتی‌بادی‌های هتروفیل در محلول‌های کیت، به علت وجود آنتی‌بادی‌های هتروفیل با مشخصات متفاوت در سرم افراد، امکان وجود نتایج کاذب وجود دارد. تفسیر تست‌های عملکرد تیروئیدی با نتایج یک تست امکان پذیر نبوده و نتایج این آزمایش باید با نتایج سایر تست‌های تیروئیدی به طور همزمان تفسیر شود. در هنگام تفسیر نتایج آزمایش‌های انجام شده با این کیت باید به تداخلات مختلف فیزیولوژیکی مثل مصرف داروهای خاص و سابقه بیماری توجه شود.

شاخص‌های اجرایی:

(۱) حداقل مقدار قابل اندازه‌گیری:

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت TSH قابل تشخیص در این کیت 0.1 mIU/L می‌باشد. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP17-A2 انجام شده است.

(۲) دقت آزمایش:

آزمایش‌های Intra Assay (هم‌خوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و Inter Assay (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. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP05-A3 انجام شده است.

جدول ۱- نتایج Intra Assay

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 ۲- نتایج Inter Assay

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 به صورت داپلیکیت انجام شده است.

۳) ریکاوری آزمایش:

مقادیر معلومی از TSH به ۴ نمونه سرم با غلظت‌های مشخص TSH افزوده شد و ریکاوری محاسبه شده آن‌ها عددی بین 100 ± 10 درصد را نشان داد. نتایج مربوطه در جدول ۳ آمده است. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP34 انجام شده است.

جدول ۳ - نتایج ریکاوری آزمایش.

نمونه	مقدار TSH موجود در نمونه (mIU/L)	مقدار افزوده شده TSH (mIU/L)	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	۲/۸	۲/۵	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

۴) خطی بودن آزمایش:

با استفاده از استاندارد صفر، رقت‌های متوالی از ۴ نمونه سرم با غلظت مشخص از TSH تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت محاسبه شد که در جدول ۴ نتایج آن آورده شده است. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP06-A انجام شده است.

جدول ۴ - نتایج بررسی ریکاوری آزمایش.

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

۵) اختصاصیت آزمایش:

اختصاصیت این آزمایش به کمک سرم‌هایی با غلظت‌های مختلف hFSH، hLH و hCG به منظور بررسی واکنش‌های متقاطع با TSH سنجیده شد که نتایج آن در جدول ۵ آمده است. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP14-A3 انجام شده است.

جدول ۵ - نتایج تست اختصاصیت (واکنش متقاطع).

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
















۶) اثر هوک (Hook Effect):

آزمایش TSH بر روی سرم‌هایی با غلظت بسیار بالا از این آنالیت (تا 500 mIU/L) صورت گرفت که پدیده هوک مشاهده نشد. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP34 انجام شده است.

منابع:

- Cobb W.E., Lamberton R.P Jackson I.M.D. (1984) Use of a rapid, sensitive immunoradiometric assay for thyrotropin to distinguish normal from hyperthyroid subjects. Clin. Chem. 30:1558-1560. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6467571/>)
- Helenius T., Tikanoja S. (1986) A sensitive and practical immunoradiometric assay of thyrotropin. Clin. Chem. 32 :514-518. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3948396/>)
- Woodhead J.S., Weeks I. (1985) Circulating thyrotrophin as an index of thyroid function. Ann. Clin. Biochem. 22:455-459. (<https://doi.org/10.1177/000456328502200502>)
- 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. (<https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.1986.tb01690.x>)

جدول علائم:

	Use by	تاریخ انقضاء
	Batch code	شماره سری ساخت
	Serial number	شماره سریال
	Date of manufacture	تاریخ تولید
	Catalogue number	شماره کاتالوگ
	Caution: consult accompanying documents	توجه به مدارک همراه
	Manufacturer	تولیدکننده
	Contains sufficient for <n> tests	محتویات برای n تست کافیت
	In vitro diagnostic medical devices	فراورده تشخیصی
	Temperature limitation	محدوده دمای نگهداری
	Consult instructions for use	کتابچه راهنما
	Biological risks	خطرات زیستی
	Control	کنترل
	Negative control	کنترل منفی
	Positive control	کنترل مثبت

روش انجام آزمایش TSH به صورت شماتیک

چاهک‌های کوت شده با آنتی‌بادی ضد TSH			
محلول‌ها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
استانداردها	۵۰ میکرولیتر	-	-
سرم کنترل	-	۵۰ میکرولیتر	-
نمونه	-	-	۵۰ میکرولیتر
آنزیم کونژوگه	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
پلیت را به ملایمت برای مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهک‌ها بخوبی مخلوط شوند و سپس دهانه چاهک‌ها را با برچسب 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 با طول موج 450 nm (و در صورت امکان 630 nm به عنوان فیلتر فرانس) خوانش کنید.			

جدول محتویات کیت

محتویات کیت	فرمت ۴۸ تستی	فرمت ۹۶ تستی	فرمت ۱۹۲ تستی
پلیت Plate	1x48-wells	1x96-wells	2x96-wells
محلول آنزیم کونژوگه Enzyme Conjugate	1x6 ml	1x12 ml	2x12 ml
سری استانداردها Standard Set	St.0: 1x1 ml Other St.: 5x0.5 ml	St.0: 1x2 ml Other St.: 5x1 ml	St.0: 1x4 ml Other St.: 5x2 ml
سرم کنترل Control Serum	1x0.5 ml	1x1 ml	1x2 ml
محلول رنگ‌زای یک مرحله‌ای Chromogen - Substrate	1x6 ml	1x12 ml	2x12 ml
محلول شستشو Wash Solution	1x25 ml	1x50 ml	2x50 ml
محلول متوقف کننده Stop Solution	1x6 ml	1x12 ml	2x12 ml
برچسب مخصوص پلیت Cardboard Sealer	1	1	2
دستورالعمل استفاده Instruction for Use	1	1	1