راهنمای کیت TSH

مقدمه:

TSH یک هورمون گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی 26600 دالتون میباشد که توسط سلول های تیروتروپیک بخش قدامی غده هیپوفیز ترشح میگردد. دارای دو زیر واحد الفا وبتا می باشد که زیر واحد آلفا آن با زیر واحدهای آلفای FSH, LH, HCG تشابه شیمیائی دارد.

TSH رشد واسکولاریتی غده تیروئید و رشد سلولهای فولیکولار را تحریک می کند و مراحل سنتز هورمونهای تیروئیدی (مثل جذب ید ، اورگانیفیکاسیون ید به تیروزین و جفت شدن تیروزین ها و ترشحات پروتئولیتیک هورمون های ذخیره تیروئید از ذخایر تیروگلوبولین) را تسریع می کند.

TSHترشح هورمون های T3 و T4 ذخیره در تیروئید را افزایش می دهد.

در مورد عمل TSH برای بررسی اعمال هیپوفیز با ارزیابی ترشحی آنها در بیماران مبتلا به تومور هیپوفیز 2 موردقابل توجه است:

1- تشخیص کمبود هورمون قبل و بعد از درمان
2- تشخیص تومورهای تولید کننده هورمون را میسر می سازد.

محدوده طبیعی:

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

سن	µIu/ml یا mIu/L
نوزاد نارس	27-7
1-4 روزه	39-1
2-20 هفته	1/7 -9/1
5 ماهه تا 20 ساله	0/6-7/4
21 -54 ساله	0/3- 5/2
55-87 ساله	0/5- 8/9

ساخت TSH توسط TRH هیپوتالاموس تنظیم می شود و غلظت هورمون های تیروئیدی موجود در خون با مکانیسم فیدبک منفی روی ترشح TSH موثرند.

اساس آزمایش :

اساس این کیت به روش ساندویچ الایزا می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادی منوکلونال بر علیه یک واحد آنتی ژنیک TSH βSubunit , Coat میشوند. نمونه بیماران با آنتی بادی Coat شده در چاهکها مجاور می شود، سپس آنتی بادی ثانویه متصل به آنزیم HRP به چاهکها اضافه می شود که باعث ایجاد یک کمپلکس ایمنی می شود که نشانگر غلظت TSH در نمونه ها می باشد. در ادامه پس از شستشو ، محلول رنگزا که حاوی H2O2 و کروموژن است به داخل چاهکها ریخته میشود و تولید رنگ آبی می کند که رنگ آبی تولید شده متناسب با کمپلکس ایمنی ایجاد شده در چاهکها می باشد. با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل میشود که بهترین جذب نوری را در طول موج 450 نانومتر دارد.

جمع آوري و أماده سازي نمونه :

سرم يا پلاسما را مي توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود . نمونه را مي توان به مدت دو روز در دماي 2 تا 8 درجه سانتي گراد ويا براي مدت زمان طولاني تر (ماكزيمم 30 روز) در دماي 20- درجه سانتيگراد نگهداري كرد.(درضمن بايد از Freeze – Thaw نمودن پرهيز شود).

محتویات کیت :

1- یک عدد پلیت حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد TSH (Anti -TSH Coated Plate) دارای 96 چاهک
2- سری استاندارد (Standard Set) : 7 ویال استاندارد دارای غلظت های mIu/L صفر، 0.5، 2.5، 5، 10، 20، 40 که هر ویال محتوی 1 میلی لیتر می باشد.
3- سرم کنترل (Control Serum) : یک ویال حاوی 1 میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص نوشته شده روی برچسب ویال
4- محلول رقیق کننده نمونه ها (Sample Diluent) : یک ویال حاوی 1 میلی لیتر برای رقیق کردن نمونه هائی که غلظت بالاتری از بالاترین استاندارد کیت را دارا می باشند.
5- محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی 12 میلی لیتر محلول حاوی TSH کنژوکه شده با HRP .
6- محلول شستشو (Washing Solution) : یک ویال حاوی 40 میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (25 X) که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف مقدار لازم از محلول شستشوی غلیظ را به نسبت 1/25 با آب مقطر رقیق کنید.
7- محلول رنگزا (Chromogen Substrate) : یک ویال محتوی 12 میلی لیتر و آماده برای مصرف.
8- محلول متوقف کننده (Stop Solution) :یک ویال محتوی 12 میلی لیتر.
9- بر چسب مخصوص پلیت (Card Board Sealer)

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

1- دستگاه خوانش الایزا (Eliza Reader) دارای فیلتر 450 نانومتر ودر صورت امکان 630 به عنوان فیلتر رفرانس.

2- سمپلر های 50 و 100 میکرولیتر دقیق
3- آب مقطر

نکات قابل ذکر براي مصرف کنندگان :

1- محتويات اين كيت براي مصرف در همين كيت مي باشد .
2- از مخلوط كردن محتويات كيتها باشماره ساختهاي مختلف جدا" خودداري نمائيد .
3- كليه مواد موجود در كيت كه منشاء سرمي دارند از نظر وجود HIV,HCV, HBs AG كنترل گرديده اند و فاقد اين عوامل مي باشند . جهت احتياط بهتراست هر كاربري كه با كيت كار مي كند از تماس مستقيم با مواد بپرهيزد .

توضيحات عمومي:

1- قبل از شروع مراحل آزمايش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق رسانده و به خوبي تكان دهيد تا كاملا" يكنواخت شوند.
2- بهتراست به محض شروع آزمايش كليه مراحل بدون توقف انجام پذيرند .
3- ازنوك سمپلر يك بار مصرف براي هر نمونه استفاده كنيد .
4- پس از افزودن محلول متوقف كننده ، جذب نوري چاهكها حداكثر تا نيم ساعت قابل قرائت مي باشد .
5- براي كسب نتايج مطلوب بايد شستشوي چاهكها بصورت كامل صورت گرفته وآخرين قطرات پس از شستشو از چاهكها تخليه شوند .
6- از مهمترين فاكتورها در حصول نتيجه مطلوب ، زمان انكو باسيون مناسب مي باشد ، بنابراين پيشنهاد مي گردد قبل از شروع آزمايش تمام مواد و محلولهاي مورد نيازرا آماده نموده و درب محلولهاي مورد نياز را باز كنيد ، اين عمل با كاهش فاصله زماني بين مراحل سمپلينگ باعث نتايج دقيقتري ميشود.
7- بهتر است كه حجم انجام تست محدود باشد وزمان ريختن نمونه ها پيش از 5 دقيقه به طول نيانجامد .

مراحل انجام آزمايش :

1- تعداد چاهكهاي مورد نظر را انتخاب نموده و باقي چاهكها را به همراه نمگير درون كيسه مخصوص نگهداري پليت قرار داده و درب آن را ببنديد .
2- 50 ميكروليتر از هر استاندارد ، سرم كنترل و نمونه را به داخل هر چاهك بريزيد ، پيشنهاد مي گردد كه از استانداردها و نمونه ها به صورت داپليكيت استفاده شود بدين معني كه هر استاندارد و نمونه را در دوچاهك بريزيد و در انتها از ميانگين جذب نوري آنها براي محاسبه نتايج استفاده كنيد .
3- 100 ميكروليتر از محلول آنزيم كنژوگه (Enzyme Conjugate) را به هر چاهك اضافه نموده و پليت را به آرامي به مدت 15 ثانيه تكان دهيد تا محتويات آن بخوبي مخلوط شوند .
4- درب چاهكها را با برچسب مخصوص پليت پوشانده و چاهكها را به مدت 60 دقيقه در درجه حرارت اتاق (28-22 درجه ساتيگراد) انكوبه نمائيد .
5- محتويات چاهكها را خالي كرده و چاهكها را 5 بار با محلول شستشوي آماده مصرف بشوئيد (براي شستشو مي توان از سمپلر 8 كانالـه استفاده نمود ولي بايد مواظب بود كه محلول شستشو از يك چاهك به چاهك ديگر وارد نشود زيرا مي تواند موجب ايجاد خطا در نتيجه آزمايش گردد). در هر دفعه شستشو حدود 300 ميكروليتر محلول شستشو در هر چاهك ريخته و سپس چاهك ها را درحالت وارونه و با ضربات ملايم بر روي يك پارچه يا كاغذ نمگير بكوبيد تا قطرات اضافي محلول شستشو خارج شوند.
6- 100 ميكروليتر محلول رنگزا (Chromogen – Substrate) به هرچاهك اضافه نمائيد .
7- چاهكها را به مدت 15 دقيقه در درجه حرارت اتاق و درتاريكي انكوبه نمائيد .
8- با اضافه كردن 100 ميكروليتر محلول متوقف كننده (Stop Solution) به هرچاهك ادامه واكنشهاي آنزيمي را متوقف نمائيد . براي سنجش جذب نوري هرچاهك از دستگاه الايزا ريدر با فيلتر 450 nm استفاده نمائيد .(توصيه مي شود از فيلتر 630 nm به عنوان فيلتر رفرانس استفاده گردد.)

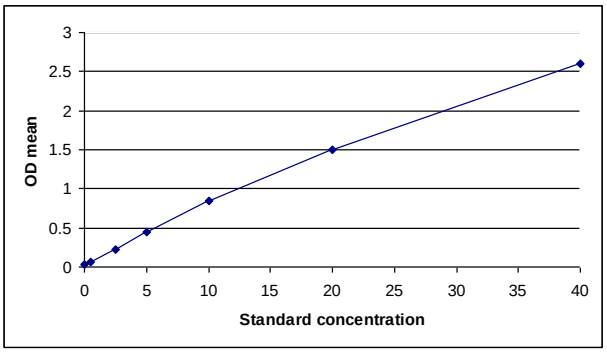
شرايط نگهداري فرآورده تشخيصي:

1- دماي نگهداري كيت بين 'C 8-2 مي باشد و بهتراست كه در 'C 4 نگهداري شود .
2- با توجه به انجام تست هاي accelerate , Full Term اين كيت درصورت رعايت موارد نگهداري صحيح تا 12 ماه پايدار مي باشد ودر اين مدت كيت حاضر بالاي 90 درصد كارايي اوليه را داراست. با توجه به آزمايشات انجام شده در صورت باز نمودن كيت يک ماه پايدار می باشد .
3- چاهكها را در كيسه مخصوص پليت همراه با نمگير نگهداري نمائيد .
4- **توجه :** درصورت بازشدن درب كيت و محلول ها تازماني كه آلودگي ميكروبي و قارچي رخ ندهد كيت پايدار خواهند بود.

محاسبه نتايج :

1- جذب نوری استاندارد ها و نمونه ها را به کمک دستگاه Eliza Reader در طول موج nm450 و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس nm630 بخوانید.
2- با استفاده از میانگین جذب نوری استاندارد ها 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 ،در ادامه نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمائید تا منحنی بدست آید.
3- 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 نمائید بطوریکه این خط کاملا بر محور عمودی عمود باشد و در ادامه 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.

	استانداردها (mIU/L)	جذب نوری
St 1	0	0.018
St 2	0.5	0.06
St 3	2.5	0.23
St 4	5.0	0.45
St 5	10	0.85
St 6	20	1.5
St 7	40	2.6



توجه : جذب های نوری و منحنی مربوط فقط به عنوان نمونه می باشند و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

شاخصهاي اجرائي:

1- حداقل مقدار قابل اندازه گيري :
براساس جذب نوري استاندارد صفر و سه برابر انحراف معيار (SD)حداقل غلظت TSH قابل تشخيص در اين كيت 0.1mIu/L مي باشد .

2- دقت آزمايش :
آزمايشهاي اينترا- اسي (همخواني غلظت مشخص از يك نمونه در يك سري آزمايش) و اينتر- اسي (همخواني غلظت مشخص ازيك نمونه در سري آزمايشهاي مختلف) بااستفاده از4 استاندارد با غلظتهاي مختلف TSH انجام گرديد كه در جداول 1و2 آمده است .

جدول شماره 1 (اينترا- اسي)

نمونه	تعداد دفعات تكرار	ميانگين mIU/L	SD mIU/L	CV%
1	12	0/5	0/042	6/5
2	12	5	0/17	5/3
3	12	10	0/32	5/4
4	12	40	0/85	3/9

جدول شماره 2 (اينتر- اسي)

نمونه	تعداد دفعات تكرار	ميانگين mIU/L	SD mIU/L	CV%
1	5	0/5	0/049	9/4
2	5	5	0/16	5/2
3	5	10	0/39	6/6
4	5	40	0/94	4/5

هرسري آزمايش بصورت Duplicate انجام شده است .

3- ريكاوري آزمايش :
مقادير معلومي از TSH به 4 سرم با غلظتهاي مشخص TSH افزوده شد و ريكاوري آنها محاسبه گرديد كه نتايج آن در جدول زير آمده است .

جدول ريكاوري :

نمونه	مقدار TSH موجود درسرم (mIU/L)	مقدار افزوده شده TSH (mIU/L)	مقدار مورد انتظار (mIU/L)	مقدار بدست آمده (mIU/L)	ريكاوري (%)
1	0/4	0/5	0/45	0/5	111
1	0/4	5	2/7	2/65	98
1	0/4	20	10/2	9/5	93
2	1/5	0/5	1/0	1/05	105
2	1/5	5	3/25	3/1	95
2	1/5	20	10/75	10/2	94
3	3/8	0/5	2/15	2/0	93
3	3/8	5	4/4	4/4	100
3	3/8	20	11/9	11/5	96
4	8/5	0/5	4/5	4/7	104
4	8/5	5	6/75	6/9	102
4	8/5	20	14/25	13/5	94

4- خطي بودن آزمايش :

به كمك استاندارد صفر رقتهاي متوالي 4 نمونه سرم با غلظت مشخص از TSH تهيه گرديد و نتايج بر اساس ضريب رقت محاسبه شد كه درجدول صفحه بعد نتايج آن آورده شده است .

جدول خطي بودن :

نمونه	مقدار TSHموجود در سرم رقيق نشده (mIU/L)	ريكاوري (%)			
		رقت 25%	رقت 50%	رقت 75%	100%
1	2/5	100	95	101	98
2	5	99	96	99	100
3	20	95	92	99/8	90

5- اختصاصيت آزمايش :

اختصاصيت اين آزمايش به كمك سرمهايي با غلظتهاي مختلف beta HCG, human FSH ,human LH جهت بررسي واكنشهاي متقاطع با TSH بررسي شد كه نتايج آن در جدول زير آمده است .

جدول اختصاصيت (واكنش متقاطع)

آناليت	غلظت	غلظت ظاهري TSH (mlu/L)
hFSH(IU/L)	1000 100 10	<0.1 <0.1 <0.1
hLH(IU/L)	1000 100 10	<0.1 <0.1 <0.1
hCG(IU/L)	100000 10000 1000	<0.1 <0.1 <0.1

6- اثر هوك (Hook Effect)

آزمايش TSHجهت سرمهايي با غلظت بسيار بالا از اين آناليت (500 mIU/L) صورت گرفت كه پديده هوك مشاهده نشد .

References

1. 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.
2. Helenius T., Tikanoja S. 1986. A sensitive and practical immunoradiometric assay of thyrotropin. Clin. Chem. 32:514-518
3. Woodhead J.S., Weeks I., 1985. Circulating thyrotropin as an index of thyroid function. Ann. Clin. Biochem. 22:455-459.
4. 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.

Adress :
No:1161 , Bid Avenue , Payetakht , Industrial zone , Tehran , Iran
Tel : +98 21 66 56 91 84 - 66 59 37 41 Fax : +98 21 66 56 14 28
Email : info@biokarpira.com
www.biokarpira.com

043 ISO 9001-2008 13485