# کیت الایزای حساس برای تعیین غلظت هورمون محرک غده تیروئید انسانی

(۹۶ تستی)

## Human Thyroid Stimulating Hormone (TSH) Sensitive ELISA Kit

**مقدمه :**

هورمون محرک غده تیروئید (تیروتروپین، TSH) نوعی گلیکوپروتئین با وزن ملکولی ۲۸/۰۰۰ دالتون می باشد که از غده هیپوفیز ترشح می شود. این هورمون دارای دو زیرواحد متفاوت بنام زنجیره آلفا و زنجیره بتا می باشد که توسط پیوند غیرکووالانی بهم متصل هستند. ساختمان اولیه زنجیره آلفای TSH با زنجیره آلفای سایر گنادوتروپین ها یکسان است، ولی زنجیره بتای آنها متفاوت است. این زنجیره بتا مسئول عملیات ایمونولوژیکی و خصوصیات بیولوژیکی این هورمون ها می باشد.

سنتز و آزادسازی TSH از طریق غلظت هورمون های تیروئیدی T3 و T4 ، توسط هورمون آزاد کننده تیروتروپین (TRH) هیپوتالاموس کنترل می شود. هورمون های تیروئیدی، ترشح TSH را از طریق مکانیسم فیدبک منفی تنظیم می کنند. بعبارت دیگر، افزایش غیرطبیعی غلظت خونی T3 و T4 باعث توقف ترشح TSH می شود، همچنین کاهش غلظت T3 و T4 در خون، باعث افزایش ترشح TSH می گردد. افزایش غلظت سرمی TSH اولین و بهترین نشانگر کم کاری اولیه تیروئید می باشد. اندازه گیری غلظت TSH در سرم برای تشخیص بیماری های مختلف غده تیروئید و ارزیابی عملکرد محور هیپوفیز- هیپوتالاموس بکار می رود.

**اساس روش اندازه گیری :**

کیت الایزای TSH موجود، براساس سنجش ایمونولوژیکی آنزیمی ساندوویچی تهیه شده است. TSH موجود درنمونه ها بعنوان آنتی ژن به دو آنتی بادی زوج اختصاصی خود متصل می گردد. هر دو آنتی بادی از نوع منوکلونال موشی هستند که یکی برروی فاز جامد (چاهک ها) پوشش داده شده است و دیگری به آنزیم HRP متصل شده است. نمونه مورد آزمایش که دارای TSH است، در معرض دو آنتی بادی قرار می گیرد. پس از زمان انکوباسیون، چاهک ها تخلیه شده و شستشو داده می شوند تا آنتی بادی متصل به آنزیم HRP اضافی خارج گردد. سپس به هرچاهک سوبسترای آنزیم اضافه می شود که فعالیت آنزیم بطور مستقیم با غلظت TSH در نمونه ها متناسب است. استانداردهای TSH با غلظت مشخص، همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که براساس منحنی استاندارد جذب نور در مقابل غلظت TSH، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید.

**معرف ها :**

۱- میکروپلیت پوشش داده شده: شامل ۹۶ چاهک جداشدنی که با آنتی بادی منوکلونال موشی ضد TSH پوشش داده شده اند.

۲- کونژوگه آنزیمی (HRP-Anti-TSH) : یک ویال ۱۲ میلی لیتری آماده مصرف.

۳- استانداردها : ۷ ویال یک میلی لیتری از استاندارد با غلظت های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۵ براساس µIU/ml که در سرم نرمال انسانی تهیه شده و از تیومرسال بعنوان نگهدارنده استفاده شده است.

۴- سرم کنترل: یک ویال یک میلی لیتری آماده مصرف.

۵- محلول شستشو دهنده غلیظ (20X) : یک ویال ۲۵ میلی لیتری محلول شستشو که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف لازم است این محلول به نسبت ۱/۲۰ با آب دیونیزه رقیق شود.

۶- محلول رنگ زا: یک ویال ۱۲ میلی لیتری محلول آماده مصرف

۷- محلول متوقف کننده واکنش: یک ویال ۱۲ میلی لیتری اسیدسولفوریک یک نرمال.

**مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :**

۱- سمپلر ۱۰۰ میکرولیتری دقیق

۲- آب دیونیزه

۳- دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.

۴- کاغذ جاذب رطوبت

۵- انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد

**نکات قابل توجه برای مصرف کنندگان :**

۱- در این کیت از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر HbsAg و HIV منفی بوده اند.

۲- از تماس محلول متوقف کننده واکنش ($1N\ H_2SO_4$) با پوست خودداری کنید. در صورت تماس، با آب فراوان آنرا بشوئید.

۳- از استفاده از مواد پس از تاریخ انقضاء خودداری کنید و از مخلوط کردن یا استفاده از کیت ها با شماره بچ مختلف پرهیز نمائید.

۴- درب ظروف را پس از استفاده ببندید و از تعویض درب ها جدا خودداری کنید.

۵- محلول های محتوی مواد افزودنی یا نگهدارنده مثل سدیم آزاید نباید در واکنش آنزیمی وارد شوند.

**تهیه و جمع آوری نمونه :**

۱- آزمایش را باید بر روی نمونه های سرمی انجام داد. نمونه های شدیدا همولیزه و دارای چربی باید حذف شوند.

۲- نمونه ها را می توان برای هفت روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد و برای زمان های طولانی تر (تا سی روز) در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمود.

۳- از انجماد و ذوب مکرر نمونه ها باید خودداری کرد.

۴- در مواردی که مقدار TSH نمونه بیش از ۲۵ µIU/ml باشد، نمونه را با استاندارد صفر رقیق نموده و سپس آزمایش را تکرار نمائید.

**آماده سازی معرف ها :**

۱- کلیه معرف ها را به دمای اتاق برسانید. قبل از استفاده آنها را به آرامی سر و ته نمائید.

۲- برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب دیونیزه رقیق نمائید.

## روش انجام آزمایش :

۱- تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده آبگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.

۲- ۱۰۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر چاهک بریزید.

۳- ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی (HRP-Anti-TSH) را به تمام چاهک ها اضافه کنید.

۴- پلیت را بمدت ۶۰- ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها خوب مخلوط شوند. سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا بمدت یک ساعت در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد و تاریکی انکوبه کنید.

۵- محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را ۵ بار با ۳۰۰ میکرولیتر بافر شستشوی آماده مصرف بشوئید. برای شستشوی چاهک ها، ابتدا ۳۰۰ میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک ها را وارونه کرده و همراه با تکان د ادن خالی کنید و در انتهای شستشو، با ضربات ملایم بر روی کاغذ جاذب تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.

۶- ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را بمدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

۷- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همه چاهک ها اضافه کنید. سپس جذب نور هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید). سنجش جذب نوری باید حداکثر تا ۳۰ دقیقه پس از اتمام آزمایش انجام شود.

## محاسبه نتایج

۱- با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استانداردی رسم کنید.

۲- میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

## راهنمای محاسبه

مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل تنها بعنوان راهنمایی آورده شده است و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید بدست آورد.

| ردیف | مقدار استاندارد (µIU/ml) | جذب |
|---|---|---|
| 1 | 0 | 0.02 |
| 2 | 0.25 | 0.08 |
| 3 | 0.5 | 0.13 |
| 4 | 2.5 | 0.44 |
| 5 | 5 | 0.78 |
| 6 | 10 | 1.35 |
| 7 | 25 | 2.74 |

## مقادیر طبیعی

بدلیل اختلافات سنی، نژادی و رژیم تغذیه، نمی توان برای تمام جمعیت ها محدوده مرجع تعیین کرد. بنابراین هر آزمایشگاه باید محدوده مرجع خود را گزارش نماید. مقادیر طبیعی در سرم افراد نرمال که توسط آزمایشات مکرر به روش الایزا بدست آمده است به قرار زیر می باشد:

**محدوده طبیعی 0.4 – 6.0 µIU/ml**

## خصوصیات کیت

۱- حساسیت

با رقیق سازی متوالی استاندارد ۰/۲۵ با سرم صفر، حساسیت این کیت برای تعیین مقدار TSH برابر ۰/۱ µIU/ml بدست آمد.

۲- دقت

برای محاسبه میزان دقت در یک روز و روزهای مختلف، آزمایش بر روی ۳ نمونه سرم ۲۰ بار تکرار شد که ضریب تغییرات به شرح ذیل است.

ضریب تغییرات در روز

| نمونه سرم | دفعات تکرار | میانگین (µIU/ml) | انحراف معیار | ضریب تغییرات (CV) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 20 | 0.76 | 0.07 | 9.1 |
| 2 | 20 | 3.5 | 0.22 | 6.4 |
| 3 | 20 | 16.9 | 0.86 | 5.1 |

ضریب تغییرات در روزهای مختلف

| نمونه سرم | دفعات تکرار | میانگین (µIU/ml) | انحراف معیار | ضریب تغییرات (CV) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 10 | 1.4 | 0.12 | 8.6 |
| 2 | 10 | 5.1 | 0.37 | 7.3 |
| 3 | 10 | 22.0 | 0.68 | 3.1 |

۳- ویژگی

آنتی بادی های منوکلونال مورد استفاده در این کیت الایزا اختصاصی TSH انسانی می باشند. هیچگونه تداخلی با LH ، FSH و HCG انسانی در غلظت های طبیعی دیده نشده است.

۴- خطی بودن

سه نمونه مختلف سرمی با استاندارد صفر به نسبت های ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۸ رقیق شدند. سپس غلظت TSH در آنها با استفاده از کیت محاسبه شد که نتایج ذیل بدست آمد.

| نمونه سرمی | غلظت اولیه (µIU/ml) | درصد بازیابی | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1:2 | 1:4 | 1:8 |
| 1 | 2.2 | 98 | 101 | 106 |
| 2 | 10.5 | 99 | 105 | 106 |
| 3 | 33.7 | 101 | 103 | 105 |

۵- اثر هوک

در این کیت، پدیده اثر هوک تا غلظت ۲۰۰ µIU/ml دیده نشد.