

## کیت ایمونورادیومتریک اسی برای تعیین غلظت هورمون

### محرك غده تیروئید انسانی

#### Human Thyroid Stimulating Hormone (TSH) IRMA Kit

#### مقدمه

هورمون محرك 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 غیرکووالانسی 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 IRMA TSH موجود، براساس سنجش ایمونولوژیکی رادیواکتیو ساندویچی تهیه شده است. TSH موجود در نمونه 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 بر روی فاز جامد (لوله ها) پوشش داده شده است و دیگری به ید-۱۲۵ متصل شده است. نمونه مورد آزمایش که دارای TSH است، در معرض دو آنتی بادی قرار می گیرد. پس از زمان انکوباسیون، لوله ها تخلیه شده و شستشو داده می شوند تا آنتی بادی متصل به ید-۱۲۵ اضافی خارج گردد. سپس اکتیویته موجود در هر لوله توسط شمارنده گاما اندازه گیری می شود که این اکتیویته 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 مقدار شمارش مقابل غلظت TSH، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید.

#### معرف ها

۱- لوله های پوشش داده شده: شامل ۱۰۰ لوله که با آنتی بادی منوکلونال موشی ضد TSH پوشش داده شده اند.

۲- ردیاب (آنتی بادی علیه TSH نشاندار شده با ید-۱۲۵): یک ویال ۱۲ میلی لیتری آماده مصرف.

۳- استانداردها: ۸ ویال یک میلی لیتری از استاندارد با غلظت های ۰،۰/۱۵، ۰،۰/۵، ۰،۱/۵، ۰،۵، ۱،۵ و ۵۰ براساس  $\mu\text{IU/ml}$  که در سرم نرمال انسانی تهیه شده و از تیومرسال بعنوان نگهدارنده استفاده شده است.

۴- سرم کنترل: یک ویال 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 مقطر رقیق شود.

#### مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست

۱- سمپلر ۱۰۰ میکرولیتری دقیق

۲- آب دیونیزه

۳- دستگاه شمارنده گاما

۴- کاغذ جاذب رطوبت

۵- لوله های آزمایش معمولی برای شمارش تام

#### نکلت قابل توجه برای مصرف کنندگان

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

۲- از استفاده از مواد پس از تاریخ انقضاء خودداری کنید و از مخلوط کردن یا استفاده از کیت ها با شماره بیج مختلف پرهیز نمایید.

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

۴- از لباس و دستکش یکبار مصرف هنگام کار با مواد رادیواکتیو استفاده کنید.

۵- لوازم آزمایشگاهی آلوده به مواد رادیواکتیو جداگانه و با روش های ایمن (براساس دستورالعمل های حفاظت در برابر اشعه) شستشو و یا پسماند نماید.

#### تهیه و جمع آوری نمونه

۱- آزمایش را باید بر روی نمونه های سرمی و پلاسماپی انجام داد. نمونه های شدیداً 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  $100 \mu\text{IU/ml}$  باشد، نمونه را با استاندارد صفر رقیق نموده و سپس آزمایش را تکرار نمایید.

۵- معرف ها باید مستقیماً به لوله ریخته شوند.

۶- از تماس نوک سمپلر با ته لوله خودداری کنید.

#### آماده سازی معرف ها

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

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

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 IRMA بدست آمده است به قرار زیر می باشد:

### محدوده طبیعی $0.4 - 6.1 \mu\text{IU/ml}$

#### خصوصیات کیت

##### ۱- حساسیت

با رقیق سازی متوالی استاندارد  $0.15$  با سرم صفر، حساسیت این کیت برای تعیین مقدار TSH برابر  $0.05 \mu\text{IU/ml}$  بدست آمد.

##### ۲- دقت

برای محاسبه میزان دقت در یک روز و روزهای مختلف، آزمایش بر روی ۴ نمونه سرم ۲۰ بار تکرار شد که ضریب تغییرات به شرح ذیل است.

##### ضریب تغییرات در روز

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین ( $\mu\text{IU/ml}$ )	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	20	1.2	0.05	4.2
2	20	1.9	0.12	6.3
3	20	15.7	0.86	5.5
4	20	22.4	1.21	5.4

##### ضریب تغییرات در روزهای مختلف

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین ( $\mu\text{IU/ml}$ )	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	10	1.7	0.08	4.5
2	10	2.7	0.18	6.7
3	10	10.4	0.61	5.8
4	10	17.3	0.73	4.2

##### ۳- ویژگی

آنتی بادی های منوکلونال مورد استفاده در این کیت 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  $1:2$ ،  $1:4$  و  $1:8$  رقیق شدند. سپس غلظت TSH در آنها با استفاده از کیت محاسبه شد که نتایج ذیل بدست آمد.

نمونه سرمی	غلظت اولیه ( $\mu\text{IU/ml}$ )	درصد بازیابی		
		1:2	1:4	1:8
1	2.2	105	98	95
2	4.7	110	101	99
3	7.3	108	104	102

##### ۵- اثر هوک

در این کیت، پدیده اثر هوک تا غلظت  $1000 \mu\text{IU/ml}$  دیده نشد.

۱- تعداد لوله های پوشش شده برای استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید. برای شمارش تام از لوله های معمولی استفاده کنید.  
۲- ۱۰۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر لوله بریزید.

۳- ۱۰۰ میکرولیتر از ردیاب را به تمام لوله ها اضافه کنید.

۴- لوله ها بمدت ۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات آنها خوب مخلوط شوند. سپس لوله ها را بمدت یک ساعت در همزن گردان مخصوص شرکت پادتن گستر ایثار و یا شیکر افقی (با سرعت 280 rpm) در درجه حرارت اتاق (۱۸ تا ۲۵ درجه سانتیگراد) انکوبه کنید.

۵- محتویات لوله ها را از طریق مکش یا وارونه کردن تخلیه نمائید (بجز لوله ه ای شمارش تام). سپس لوله ها را دو بار و هر بار با دو میلی لیتر محلول شستشوی آماده مصرف شستشو دهید. برای اطمینان از تخلیه کامل، با وارونه نگهداشتن لوله ها بر روی کاغذ جذب و با ضربت ملایم بر روی لوله تمامی مایع موجود در لوله ها را تخلیه کنید.

۶- با استفاده از شمارنده گاما، اکتیویته موجود در لوله ها را بمدت یک دقیقه شمارش کنید.

#### محاسبه نتایج

۱- با استفاده از میانگین شمارش استانداردها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) بر روی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد رسم کنید.  
۲- میانگین شمارش 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 شمارش 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 ( $\mu\text{IU/ml}$ )	شمارش (n=3)	B/T(%)
0	شمارش تام	200876	----
1	0	428	0.21
2	0.15	745	0.37
3	0.5	1680	0.84
4	1.5	3840	1.92
5	5	11973	6.00
6	15	34258	17.13
7	50	104748	52.37
8	100	154800	77.06