

PËRCAKTIMI I HORMONIT STIMULUES TË TIROIDES ME METODËN ELISA

FERHAT RADA, SIRI LESKOVIKU, ARBEN LASKU *

Summary

DETERMINATION OF TIREOSTIMULING I HORMONE (TSH-S) ON THE ELISA METHOD

In thin work the authores have study for the first time in oure country the role of ELISA method for the determination of TSH - S in the diagnosis thyroide disease hyperthyreose and hypothyreose.

The authors have determind the mormal value of TSH-S by the ELISA method.

For this it was made imunoinzimatik dosing in 100 sound and from the data resulted that TSH-S is 1.6 ± 1.5 U/ml nohich varies 0.30 ± 3.3 U/ml.

From this work it comes out that TSH-S dosing with the ELISA method correlates weth the clinic in the cases of hiper thyrose and also of hiperthyreose ($p > 0.06$).

Metoda ELISA me moshë relativisht të re ka filluar të përdoret në 10-vjeçarin e fundit në teknologjinë laboratorike. Në vendin tonë zbatimi i saj ka filluar rreth vitit 1985, duke e rritur gjithnjë gamën e testeve analitike (6, 7, 8, 9). Një nga testet më të rëndësishme në praktikën kliniko-laboratorike është dhe përcaktimi i TSH - S. TSH bazal lejon zbulimin vetëm të hipotiroidizmit parësor të manifestuar; si rrjedhojë e mungesës së ndjeshmërisë nuk ka kapacitet për të diferencuar hipertiroidizmin nga eutiroidizmi. Kohët e fundit testi i TSH - S i prodhuar nga Boehringer Mannheim (1) lejon të dozohen përqendrime të ulura, madje deri 0.07μ U/ml, çka shpeshherë e bën të panevojshme testin TRH që është i domosdoshëm për diagnozën diferenciale. Pë poshtë po përshkruajmë parimin e dozimit të TSH-Sensibel. Testi bazohet në parimin "Sandwich". Gjatë inkubimit të parë, TSH (antigen) i mostrës bashkohet me antikorpet e fiksuara në muret e brendshme të tubave test. Meqenëse TSH ka disa deferminante antigenike atëherë gjatë inkubimit të dytë meantikorp anti-TSH të të markuara me POD do të formohen komplekset ku TSH vendoset si "Sandwich" ndërmjet dy antikorpeve. Sasia e komplekseve të formuara do të jetë në varësi me përqendrimin e TSH në mostër.

Qëllimi i punimit

1. Të zbatohet për herë të parë në laboratoret e ventit tonë metoda ELISA për dozimin imunoenzimatik të hormonit stimulues të tiroides (TSH-së).

2. Të përcaktohet spektri optimal i absorbimit për secilën hallkë të dozuar me ELISA.

3. Të përcaktoheshin kushtet optimale të metodikave në përputhje me kushtet tona laboratorike.

4. Të standartizohet kjo metodikë nëpërmjet ndërtimit paraprak të lakores së kalibrimit.

5. Të gjendet rekoveri dhe precizioni i teknikës.

6. Të përcaktohet vlera normale e parametrit TSH-së në përputhje me kushtet tona laboratorike dhe instrumentale.

7. Të provohet ecuria e metodikës me klinikën nëpërmjet dozimit të TSH-S me metodën ELISA dhe të gjendet shkalla e korelimit kliniko - biologjik.

Materiali dhe metodika e studimit

Punimi ynë konsiston në eksperimentimin dhe vënien në zbatim në laboratorin biokimik qendror të teknikës së dozimit me metodën ELISA i hormonit stimulues të tiroides (TSH - S).

Në materialin tonë eksperimental përfshihen rreth 370 eksperimente. Kriteret eksperimentale që kemi ndjekur për eksperimentimin e teknikës imunoenzimike i kemi përshkruar hollësisht gjatë eksperimentit. Përcaktimi i hormonit stimulues të tiroides i paraqitur në këtë punim është bërë me kite të firmës Boehringer Mannheim.

Matjet spektrofotometrike janë bërë mespekol-11 prodhimi i firmës gjermane Karl Zeiss Jena.

Rezultati dhe diskutimi

Përbërja sasiore e kiteve, përgatitja e tretësirave si dhe teknika e kryerjes jepen hollësisht në instruksionin shoqërues të kitit (1).

* Dërguar në redaksi më 7 maj 1991, miratuar për botim më 28 dhjetor 1991. Nga Laboratori Klinik Biokimik i Qendrës Spitalore Universitare Tiranë (F. R. S. L. A. L.).

Adresa për letërkëmbim: Rada F., Laboratori Klinik Biokimik, Qendra Spitalore Universitare Tiranë.

Për përcaktimin e gjatësisë së valës optimale të metodës të TSH-S rekomandohet nga instruksioni matjet me llampë zhive në gjatësinë e valës 405 nm, dhe 420 nm në spektrofotometer.

Për TSH-S u preferua leximi spektrofotometrik në spekol-II në gjatësinë e valës 420 nm. Si kriter për të vlerësuar efektshmërinë e matjes së absorbimit në 420 nm ju referuan standartit 4 g për të cilin rekomandohet në instruksionin origjinal që raporti absorbim 0.5 duhet të jetë më i madh se 1.5. Kështu të dhënat e këtij raporti nën 1.5 u konsideruan jo të pranueshëm për matjen imunoenzimike të TSH-së.

Sipas të dhënave tona eksperimentale u gjet se A/0.5 lëkundje nga 1.8 deri në 3.2 gjatësie periudhë 1

mujore, çka është dhe koha maksimale e harxhimit të kitit nëpërputhje me numrin e mostrave të serumit që u dozua në laboratorin tonë.

Që nga koha e shtimit të substratit dhe ngjyrosjes ABTS, bëhet një inkubim tjetër dhe përcatohet me spektrofotometri aktiviteti i POD të lidhur me: muret e tubit. Intensiteti i ngjyrës që zhvillohet brenda një intervali kohe të caktuar matet kundrejt tretësirës substrat-ngjyronjës i cili shërben si blank.

Të dhënat e raportit A/0.5 për TSH-së të matur në 420 nm janë paraqitur në pasqyrën Nr.1.

Pasqyra Nr.1.-A/0.5 për TSH-së në varësi të kohës së përdorimit të kitit matur me spekol-II në 420 nm.

Koha e përdorimit të kitit	A/0.5
Dita e parë	3.20
Java e parë	2.70
Java e dytë	2.40
Java e tretë	2.10
Java e katërt	1.80

Ndërtimi i kurbës së kalibrit

Kurba e kalibrit të TSH-S paraqet një veçori, sipas së cilës në boshtin e abshisave vihen përqendrimet e TSH-së në U-ml, ndërsa në atë të ordinatave në vend të ekstensionit apo absorbimit vihet raporti A/0.5 që i përgjigjet respektivisht përqendrimeve përkatëse.

Me të dhënat e fituar ndërtohet kurba e kalibrimit në të cilën lexohen përqendrimet e TSH-S serik që i korrespondon vlerës A/0.5 të mostrave të serumit.

Në fig.1. paraqitet një kurbë kalibrimi i ndërtuar me standardet 0.05; 0.43; 1.06; 2.25; 6.10;

15.30; 36.70 U/ml të matur në spekol-II me gjatësi vale 420 nm. Në këtë kurbë shihet rritja e përqendrimit të standarteve shoqërohet me rritje të absorbimit përkatës të tyre dhe për rrjedhojë rritje e raportit A/0.5.

Për të vlerësuar precizionin e metodës ELISA të TSH-së u bë matja e tij si brenda provave ashtu dhe ndërmjet tyre dhe mbi bazë të dhënave të fituara u llogarit koeficienti i variacionit CV i cili u gjet 6.4%.

Për të përcaktuar lloin emostres së gjakut ku duhen bërë dozimi imunoenzimatik i TSH-S u bënë 10 matje paralele në serume në plazmën e trajtuar me heparinë, ETDA, citrat ose oksalat. Të dhënat e fituara të përpunuëra statistikisht paraqiten në pasqyrën nr.2.

Pasqyra Nr.2. Përqendrimi i TSH-së në U/ml në varësi nga mostra e eksperimentuar.

Mostra	No	Përqendrimi i TSH-S U/ml	P
Serumi	10	2.8±0.6	
Plazëm e heparinuar	10	1.6±0.7	>0.05
Plazëm me ETDA	10	2.1±0.5	<0.05
Plazëm me citrat	10	1.9±0.4	>0.05
Plazëm e oksalatuar	10	1.8±0.7	>0.05

Nga të dhënat e paraqitura në pasqyrën nr.2 rezulton se duke ju referuar serumit të gjakut i cili preferon mostrën me ideale për dozime imunoenzimike, vihet re se përcaktimet në të gjitha llojet e plazmave që kemi përdorur për eksperimentim paraqesin ndryshime sinjifikative ($P < 0.05$).?

Në bazë të gjetjeve tona rekomandojmë që dozimet e TSH-S të bëhen në serum meqenëse dozimet

në plazmën e heparinuar të citratuar, të oksalatuar dhe në atë të marrë me ETDA janë më të ulura se në vlerat normale.

Nga eksperimentet e kryera për të përcaktuar qëndrueshmërinë apo kohën e ruajtjes së serumit rezultoi se ai mund të ruhet 1 javë në temperaturën 20-25°C, dy javë në temperaturën = 4°C dhe tre muaj në gjendje të ngrirë -20°C.

Për të gjetur vlerat normale si dhe kufirin e lëkundjes të TSH-S u bë dozimi imunoenzimatik i tij në 100 njerëz të shëndoshë. Nga të dhënat e përpunuara statikisht u gjet se vlera mesatare është $1.8 \mu\text{ U/ml}$, ndërsa devijimi standart $0.74 \mu\text{ U/ml}$. Duke hequr dhe duke shtuar dy devijime standart vlerës mesatare rezultoi se norma e TSH-S është $1.80 \pm 1.50 \mu\text{ U/ml}$, me kufi lëkundjeje $0.30\text{-}3.30 \mu\text{ U/ml}$. Boehringer Mannheim (2) jep normën $0.25\text{-}3.1 \mu\text{ U/ml}$ që është pothuaj e njëjtë me normën që kemi gjetur në me lëkundje pak a shumë të parëndësishme, e madje të pranueshme. Boehringer Mannheim duke iu referuar normës së tij i konsideron si eutoroidien të sëmurët që paraqesin TSH-S prej $0.25\text{-}3.1 \mu\text{ U/ml}$, hipertiroidien ato më të vogla se 0.25 dhe si hipotiroidien ato më të

larta se $3.1 \mu\text{ U/ml}$. Duke u mbështetur në këtë gjykim e kriter interpretues që jep Boehringes Mannheim cituar nga (3, 4, 5, 6, 9, 10) mund të përfundoj se vlerat $0.30\text{-}3.30 \mu\text{ U/ml}$ duhet konsideruar si gjendje eutiroidiene më pak se 0.30 si hipertireoze dhe ato mbi $3.30 \mu\text{ U/ml}$ si hipotireoze.

Për të studiuar ecurinë e metodës ELISA me klinikën e be dozimi në serum in e 50 të sëmurëve me hipertireoze dhe në 20 raste hipertireoze. Të dhënat e fituara u krahasuan me grupin e kontrolloit të përbërë nga 100 njerëz të shëndoshë.

Në pasqyrën nr.3 paraqitet vlera mesatare dhe devijimi standart i TSH-S në të sëmurët me hipertireoze të krahasuar me grupin e kontrollit.

Pasqyra Nr.3. $M \pm DS$ U/ml i TSH-S në të sëmurët me hipertireoze, dhe hipotireozë.

Grupi i studiuar	No	$M \pm DS \mu\text{ U/ml}$	P
Grupi i kontrollit	100	1.8 ± 0.75	
Hipertireoze	50	0.157 ± 0.047	0.05
Hipertireoze	20	18.5 ± 16.72	0.05

Nga të dhënat e paraqitura në pasqyrën Nr.3 vërehet se TSH-S ulet në mënyrë sinjifikative ($P < 0.05$) në grupin e të sëmurëve me hipertireoze të krahasuar me grupin e kontrollit. Gjithashtu nga kjo pasqyrë shihet se TSH-S rritet në mënyrë sinjifikative ($P > 0.05$) kundrejt grupit të kontrollit në të sëmurët me hipotireoze.

Pra duke iu referuar gjetjeve tona në këtë punim eksperimental mund të përfundojmë se metoda ELISA e dozimit të TSH-S ka ecuri të mirë me klinikën si në rastet me hipertireoze ashtu dhe në ato me hipotireoze.

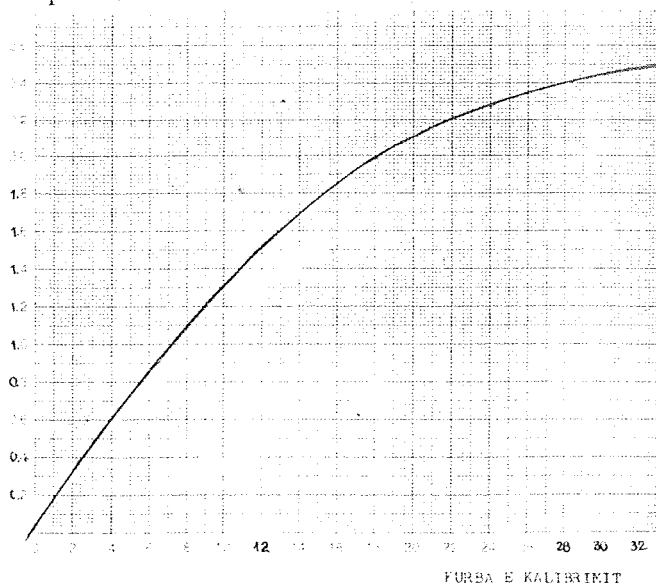


Fig. Nr. 1.

BIBLIOGRAFIA

1. **Boehringer Mannheim:** Enzymun Test TSH-S. 1989, f 9-11.
2. **Boehringer Mannheim:** Enzymun Test TSH-S clinical aspects and methodology. 1989, f. 5.
3. **Gerber H e bp.** Neue Sensitive TSH-Assay Vereinfachen die Schild-drusendiagnostik Schweiz. Med. Wschr. 1987 117: 1565-1570.
4. **Grussendoeuf M.:** TRH Test und "ultrasensitive" TSH-Bestimmung in der Modernen Schilddrusen Diagnostik, Meta Journal, 1988; 3; 180-184.
5. **Joseph K Schilddrusen-esrtdiagnostik:** TSH Immunoradiometrisch, Diagnose und labor 1985, 35, 133-149.
6. **Leskoviku S. e bp.:** Dozimi imunoenzimatik me mikrokotoden ELISA i hormonit stimulues të tiroides në serum. Rev. Mjekësore 1988, 6.
7. **Leskoviku S. e bp.:** Dozimi imunoenzimatik me mikrometoden ELISA i hormonit stumulues të tiroides. 1986, 6.
8. **Leskoviku S., Rada.F.:** Korefacioni kliniko-biokimik i dozimeve hormonele tiroidiene me metodën ELISA në hipertireoze. Revista Mjekësore 1990, 3.
9. **Leskoviku S. e bp.:** Konsiderata mbi enzimoimuno-proven ELISA në dozimet hormonele në gjak. Rev. Mjekësore 1984, 4-5, 121.
10. **Piketty ML e bp.:** Clinical significance of a low compared clin. chem. 1987, 33, 1237-1247.