การตรวจระดับ TSH ในหยดเลือดแห้งด้วยวิธี IRMA

TSH IRMA OF DRIED BLOOD SPOTS

นภาพร โตจินดา วท.ม., รศ.ฉวีวรรณ พัฒนจักร วท.ม., ศิริพร จงจีระศิริ วท.ม.,
ผศ.สุพงษ์ พัฒนจักร ค.ม.(บริหาร), นุชรี บุตระเศรณี วท.บ.(เวชนิทัศน์),
พญ.ฤดี ปลีหจินดา พ.บ., ศ.นพ.รมไทร สุวรรณิก พ.บ.

สาขาวิชาเวชศาสตร์นิวเคลียร์ ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
กรุงเทพฯ 10700.

Napaporn Tojinda, M.Sc., Chaveevan Pattanachak, M.Sc., Siriporn Chongchirasiri, M.Sc., Supong Pattanachak, M.Ed., Nucharee Putrasreni B.Sc., Rudee Pleehachinda, M.D., and Romsai Suwanik, M.D.

Section of Nuclear Medicine, Department of Radiology, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Bangkok 10700.

บทคัดย่อ

การตรวจหาระดับ TSH มีประโยชน์อย่างมากในการตรวจหา Neonatal Hypothyroidism ในประชากรที่อยู่ในบริเวณขาดสารไอโอดีน คณะผู้ทำการวิจัย จึงได้นำวิธี NETRIA IRMA ซึ่งใช้ตรวจระดับ TSH ในซีรั่ม มาประยุกต์ใช้ตรวจระดับ TSH ในหยดเลือดแห้ง หยดเลือดดังกล่าวได้จากการหยดเลือดลงบนกระดาษกรอง SS 903 แล้วปล่อยให้แห้ง 1 คืนก่อนเก็บ วิธี Modified IRMA จะใช้หยดเลือดแห้งขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม. จำนวน 1 หยด/หลอด มาผสมกับ assay buffer, labelled m-anti-TSH ที่เจือจางพอเหมาะ, และ anti-TSH-solidphase ที่เจือจางพอเหมาะ แล้วนำไปหมุนด้วย rotator เป็นเวลา 22-24 ชั่วโมง ภายหลังล้างด้วย wash buffer 2 ครั้ง นำไปวัดกัมมันตรังสีหลอดละ 1 นาที จากการทดลองพบว่า โค้งมาตรฐานที่มี TSH 0, 5, 10,

25, 100, และ 150 mIU/L มี Maximum binding ประมาณ 25% Precision profile มี %CV < 10 mIU/L ตลอดช่วงความเข้มข้น 10-150 mIU/L วิธีดังกล่าวมีความไวสูง เท่ากับ 1.65 mIU/L โดยคำนวณค่า MDC จาก MEAN + 2.5 SD Intra-assay precision มีค่า % CV เท่ากับ 6.15, 6.25 และ 6.80 สำหรับ low, medium, และ high ตามลำดับ สำหรับ Inter-assay precision มีค่า % CV เท่ากับ 7.15, 6.35 และ 6.58 ตามลำดับ หยดเลือดแห้งที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30° ซ.) หรือ 4° ซ. หรือ -20° ซ. มีความอยู่ตัวไม่ต่ำกว่า 4 เดือน เมื่อเทียบค่า TSH ในหยดเลือดแห้งกับค่า TSH ในซีรั่ม (n = 120) พบว่า r=0.9541 และ y = 1.6123 (TSH ในหยดเลือดแห้ง) + 1.382 ค่าเฉลี่ยของ TSH ในหยดเลือดแห้งที่ได้จากสายรกคนปกติ (n = 142) เท่ากับ 5.27 mIU/L วิธี MODIFIED NETRIA IRMA นี้ให้ผลดี มีความไวสูง และทำได้ง่าย ปัจจุบันกำลังใช้วิธีดังกล่าวในการทำ Mass screening ของ Neonatal Hypothyroidism

Abstract

TSH determination is most useful for screening of neonatal hypothyroid in the population in iodine deficient areas. The NETRIA IRMA method for serum TSH was applied for blood-spot TSH. Cord blood on SS No 903 filter paper was let dry overnight. The spot of 6 mm diameter, one/tube, was mixed with an assay buffer, diluted labelled m-anti-TSH, and diluted anti-TSH-solidphase. The mixture was rotated for 22-24 hours. After washing twice with wash buffer, it was counted for 1 minute. The standard curve with 0, 5, 10, 25, 50, 100, and 150 mIU/L whole blood was obtained with the maximum binding of 25%. The precision profile was satisfactory with %CV of<10 through the range of 10-150 mIU/L. The sensitivity (MDC) was good being 1.65 mIU/L as calculated by mean + 2.5 SD. The precision yielded %CV of

6.15, 6.25, and 6.80 for low, medium, and high for an intra-assay and %CV of 7.15, 6.35, and 6.58, respectively for an inter-assay. The blood spots showed the stability of at least 4 months when they were kept at room temperature (30° c) or 4° c or -20° c. The correlation between serum and blood-spot TSH values (n=120) showed r of 0.9541 and y = 1.6123 (BS-TSH) + 1.382. The mean of normal cord blood spot TSH (n=142) was 5.27 mIU/L. The technique was found to be precise, sensitive and easy to perform. Mass screening with this developed method is underway.

INTRODUCTION

Screening of neonatal hypothyroidism (NH) is useful as an indicator for severity of iodine deficiency in endemic areas of northern Thailand (3,5). Among several modalities, it appears that the NETRIA (6) bulk reagents for TSH IRMA is one of the choices. We have optimized the method for determination of TSH in dried blood spots and have found good correlation with the values in cord serum.

MATERIALS AND METHODS

The materials were: assay buffer (0.05M phosphate buffer, 1% BSA, 0.5% Tween 20, 0.1% NaN_3), wash buffer (as assay buffer without BSA), labelled m-anti-TSH and anti-TSH-CDI-cellulose obtained from the OAEP (Office of Atomic Energy for Peace).

TSH standards: Aged whole blood from the Blood Bank was adjusted at Hct of 55% (4). TSH standards (NIADDK, USA) were added to give concentrations of 0, 5, 10, 25, 50, 100, 150 mIU/L for the standard curve and 20, 60, 120 for QC (1,2,3). The blood was spotted on SS 903 filter paper and let dry overnight. It was later kept in dark plastic bags.

A spot of 6 mm, one/tube, was mixed with 100 ul assay buffer, 50 ul labelled m-anti-TSH and 50 ul anti-TSH-solid phase. After 24 hour rotation and washing twice with wash buffer, it was counted for 1 minute.

RESULTS

The results were analysed by WHO programme (A5.2) by Dr. P.R. Edwards of UK. The standard curve showed maximal binding of 25% (Fig.1). Fig.2 showed precision profile with satisfactory %CV. The sensitiviey was 1.65 mIU/L. Table 1 showed good inter- and intra-assay precision.

Stability tests showed the blood spots to last for at least 4 months at ambient temperature (Fig.3) and at 4° c and -20° c the stability was expected to be much prolonged.

Fig.4 showed good correlation of the paired serum and dried blood spot values with r of 0.9541 and y = 1.6123x + 1.382. The reference value was 5.27 +- 4.72 mIU/L. The cut-off level at +3SD was 19.4 mIU/L.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The methodology is simple, time-saving and gives no compromise to quality. The cost was brought down to 1/15 of the kit (3 bahts per case). The sensitivity is adequate since the required range of 10-150 is quite discriminative. The values of the dried blood spot approximated the paired values of cord serum. The QC values were quite satisfactory with confirmation of some alternate samples of high values. The validity of the samples was very good as judged by its prolonged stability even at ambient temperature at 4 months. The method may be recommended for the screening purpose.

Acknowledgement to the Blood Bank and Dept of Ob Gyn of the Faculty of Medicine Siriraj Hospital.

REFERENCES

1. Beachamp M, 1987. Clinical Biochemistry, Queen Alizabeth Hosptial for Children, London, U.K. Personal Contact.
2. Griffiths W, 1987. Hypothyroid Screen Lab., Department of Chem. Path., Lewisham Hospital, London, U.K. Personal Contact.
3. Larsen PR, Merker A, and Parlow AF, 1976. Immunoassay of hTSH using dried blood samples. J Clin Endocrind Metab 42:987.
4. Maeda M, Ito K, Arakawa H, and Tsuji A, 1985. An enzyme-linked immunosorbent assay for thyroxine in dried blood spotted on filter paper. J Immunol Methods 82:83-89.

5. Moore H and McMillan M, 1983. Development of a filter paper blood spot radioimmunoassay for thyroid stimulating hormone suitable for a regional neonatal screening unit. Ann Clin Biochem 20:93-99.

6. Regional training course on production and use of bulk reagents for RIA of thyroid related hormones, 8-19 December 1986, Chulalongkorn Hospital, Bangkok, Thailand.

Table 1 Showing precision of TSH IRMA for dried blood spot samples.

QC	n	MEAN ± 2SD (mIU/L)	CV(%)
Intra-assay			
Low	19	19.34 ± 2.83	6.15
Medium	20	52.15 ± 6.52	6.25
High	19	115.93 ±15.80	6.80
Inter-assay			
Low	31	20.52 ± 2.94	7.15
Medium	31	57.24 + 7.26	6.35
High	30	124.27 ± 16.34	6.58

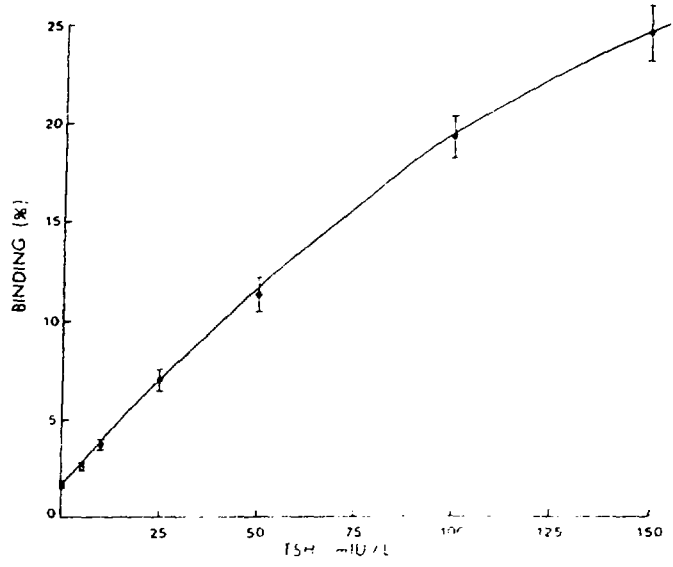

Figure 1. Showing the standard curve of blood-spot TSH IRMA.

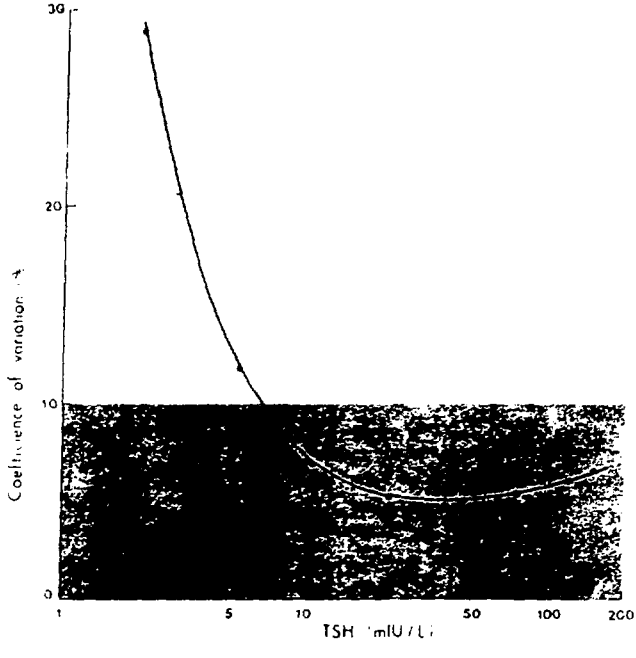

Figure 2. Showing precision profile of blood-spot TSH IRMA.

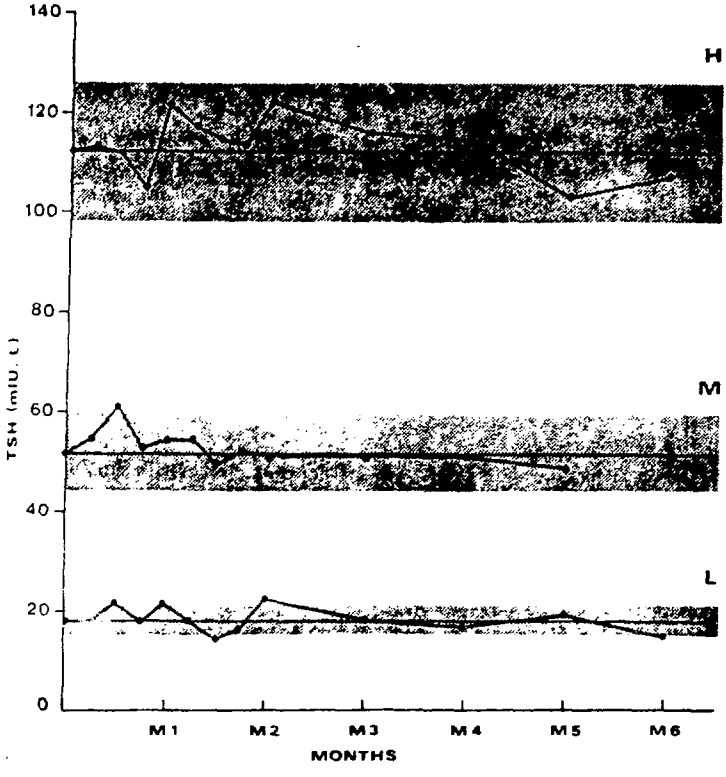

Figure 3a. Stability of blood-spot kept at an ambient temperature.

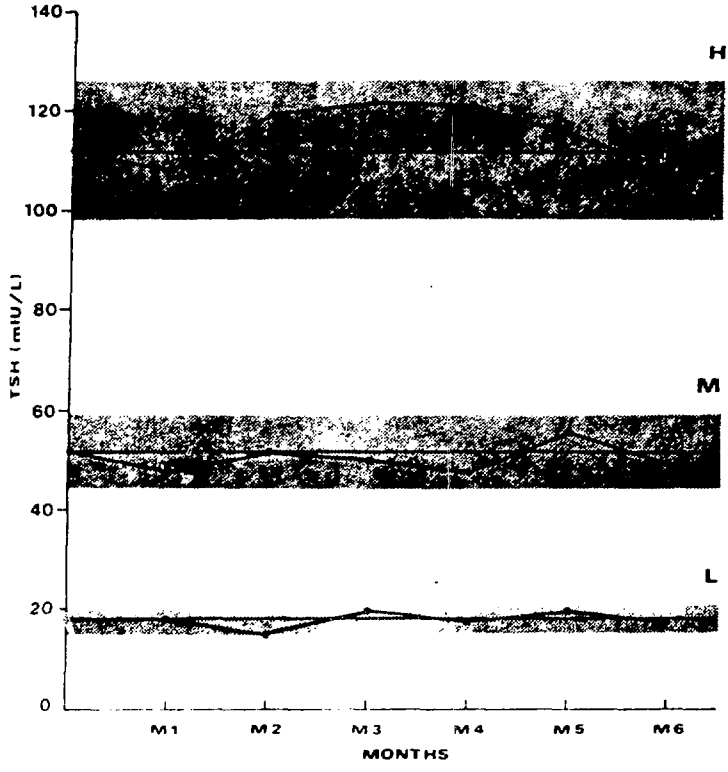

Figure 3b. Stabiligy of blood-spot kept at $4^{o}c$.

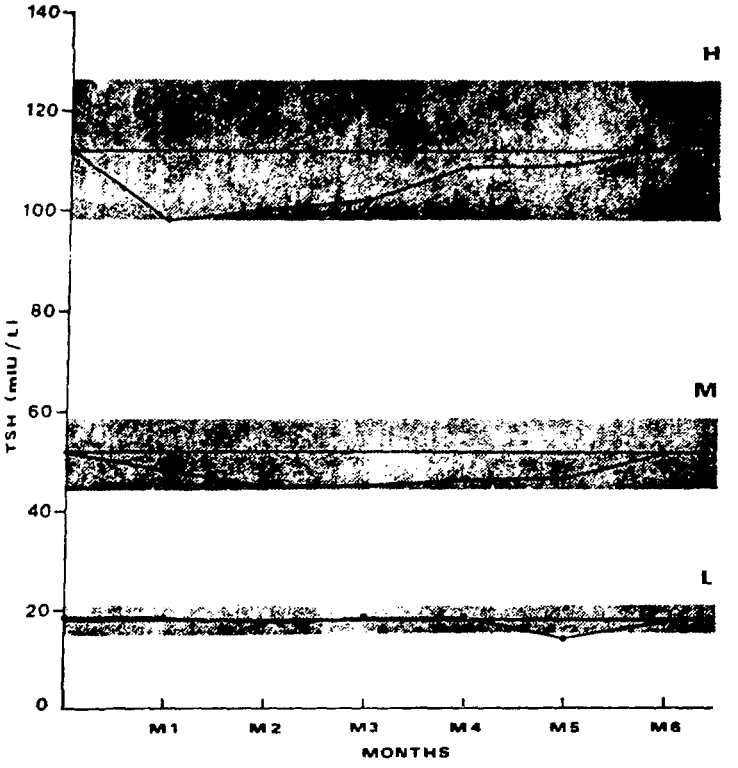

Figure 3c. Stability of blood-spot kept at -20°c.

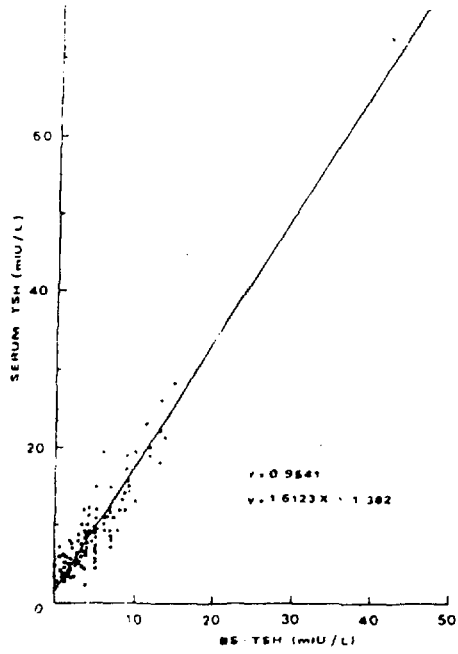

Figure 4. Corrlation of TSH values in dried blood spot and serum samples.

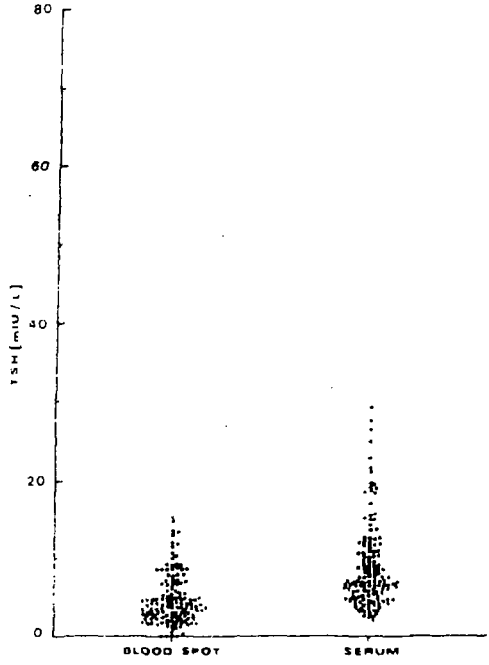

Figure 5. TSH values in normal dried blood spot and cord serum samples.