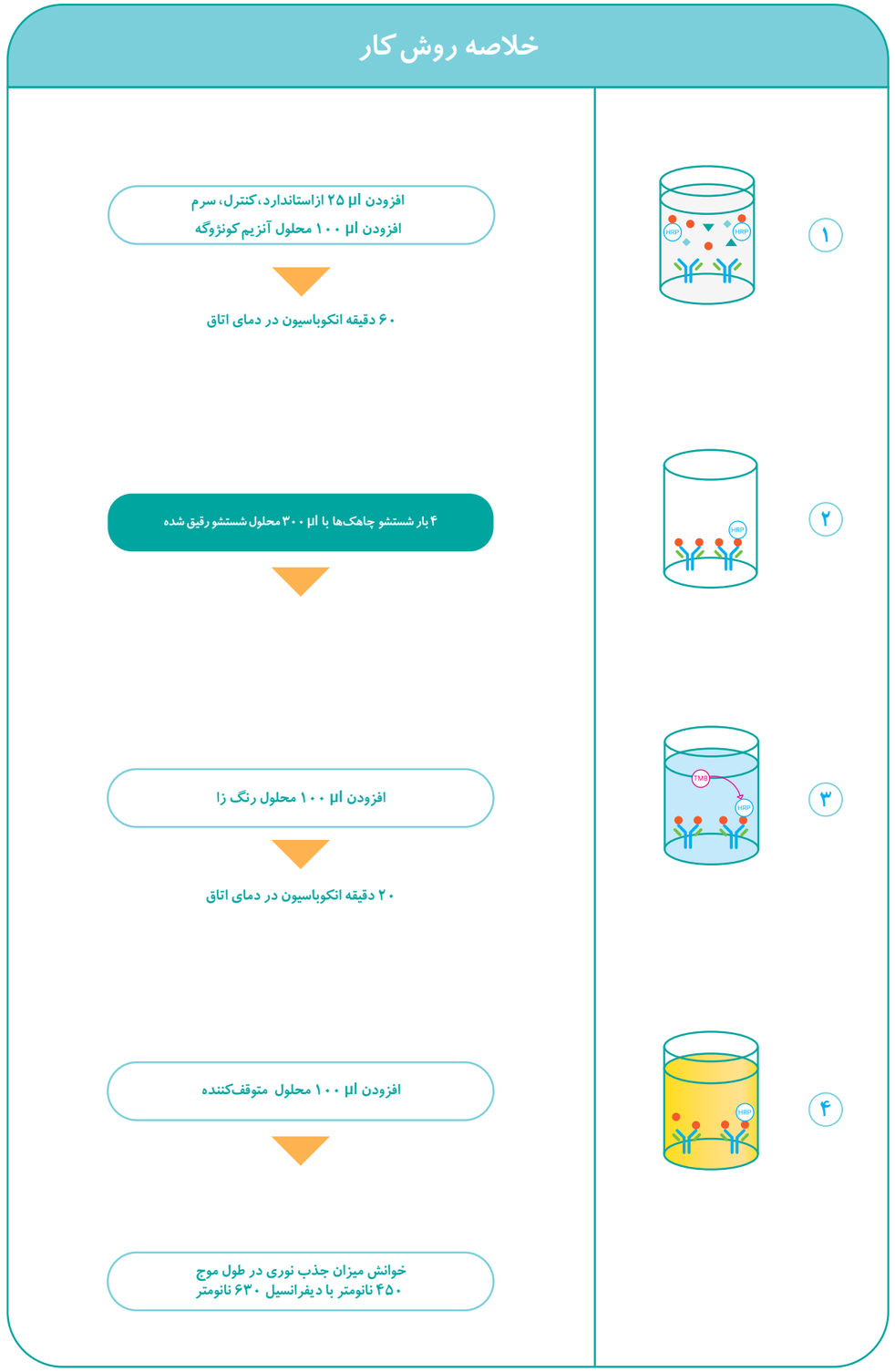
خلاصه روش کار



کاربرد

اندازه‌گیری غلظت Free T4 در سرم یا پلاسمای انسانی به‌روش ایمونوآنزیماتیک
(Cat.No. DG.FT4.01) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

مقدمه

ساختار و نقش فیزیولوژیک:

هورمون تیروکسین یا T4(3,3′,5,5′-L-tetraiodothyronine) اصلی ترین هورمون مترشحه از غده تیروئید می باشد. مولکول پیش ساز این هورمون، گلیکوپروتئین بزرگی به نام تیروگلوبولین است که حاوی ۷۰ اسید آمینه تیروزین می باشد. این اسید آمینه با جذب دو مولکول ید به دی یدوتیروزین تبدیل می گردد. سپس با ترکیب دو مولکول دی یدوتیروزین، تیروکسین تولید می شود.[۲،۱] نیمه عمر این هورمون در بدن ۷ روز بوده و تولید آن به صورت مکانیسم فیدبک منفی تحت تاثیر هورمون تیروتروپین یا TSH (Thyroid stimulating hormone) کنترل می شود. بدین ترتیب که هورمون آزاد کننده تیروتروپین یا TRH (Thyrotropin releasing hormone) مترشحه از هیپوتالاموس، منجر به تحریک سنتز TSH از غده هیپوفیز شده، سپس TSH آزاد شده با اتصال به گیرنده های اختصاصی غشاء سلولهای تیروئید موجب ترشح هورمونهای **T4** به خون می گردد. [۳،۱] فرم فعال تیروکسین به صورت **T4** آزاد است که کمتر از ۰/۱ درصد از کل **T4** سرم را شامل می شود. بیش از ۹۹/۹ درصد از کل **T4** سرم به پروتئینهای متصل شونده به **T4** یا TBP (Thyroxine binding protein) متصل است از جمله پروتئین TBG (Thyroid binding globulin) که ظرفیت بالایی برای پیوند با **T4** دارد، Transthyretin و آلبومین را می توان نام برد. [۳] این پروتئینها برقرار کننده تعادل سرم بوده و به محض جذب تیروکسین به سلولهای هدف، هورمون **T4** مورد نیاز را آزاد می کنند. [۴]

مهمترین عملکرد هورمونهای تیروئیدی تنظیم متابولیسم پایه بدن است به طوریکه افزایش یا کاهش آنها تاثیر مستقیم بر متابولیسم کربوهیدراتها، لیپیدها و پروتئینها دارد. علاوه بر آن این هورمونها از ابتدای دوره جنینی در تمایز و رشد سلولی تاثیر بسزایی دارند. بطور کلی تقریباً تمام سلولهای بدن تحت تاثیر هورمونهای تیروئیدی هستند. [۶،۵]

کاربرد بالینی: تعیین غلظت **T4** آزاد در کنار دیگر هورمونهای مترشحه از غده تیروئید و یا اثر گذار بر آن، در تشخیص افتراقی بیماریهای تیروئیدی و تعیین انواع نارسایی های غدد تیروئید، هیپوفیز و هیپوتالاموس حائز اهمیت می باشد. [۱] بر خلاف غالب روشهای اندازه گیری **T4**، تعیین غلظت **T4** آزاد تحت تاثیر میزان TBP و ویژگیهای اتصالی آن نبوده و اندازه گیری این هورمون شاخص مناسب تری جهت بررسی نارسائی های مربوطه در نمونه های حاوی TBP بالا (به طور مثال در دوران حاملگی، هیپرپروتئینمی، بیماریهای وراثتی با میزان TBG بالا، در اثر مصرف استروژن یا داروهای ضد بارداری) و نیز نمونه های حاوی TBP پایین تر از حد طبیعی (همچون هیپوپروتئینمی، آکرومگالی و برخی بیماریهای کلیوی و گوارشی) می باشد. [۷،۶]

عمده بیماریهایی که باعث افزایش **T4** آزادسرمی می شوند عبارتند از پر کاری تیروئید، بیماریهای گریوز، آدنوم تیروئید سمی، گواتر مولتی ندولار سمی، تیروئیدیت گرانولوما یا نیمه حاد، سندرم مقاومت به هورمون تیروئید و ماکرو آدنوما.

میزان هورمون **T4** آزاد درموارد کم کاری تیروئیدی ثانویه یا مرکزی، تیروئیدیت هاشیموتو، برداشتن غده تیروئید و رادیوتراپی کاهش می یابد. [۶]

اساس روش سنجش

مدت زمان انجام تست: ۶۰ دقیقه + ۲۰ دقیقه

طراحی کیت Free T4 بر اساس روش ایمونوآنزیماتیک رقابتی می باشد. در این روش Free T4 موجود در نمونه ها برای اتصال به آنتی بادی مونوکلنال ضد**T4**، پوشش داده شده بر روی چاهکها، با **T4** متصل به آنزیم پراکسیداز(T4-HRP) رقابت می کند. لذا رابطه معکوسی بین میزان T4-HRP متصل به آنتی بادی مونوکلنال ضد **T4** با غلظت Free T4 موجود در نمونه وجود دارد. پس از شستشو و خارج کردن آنالیتهای غیر متصل با افزودن سوبسترا، تترا متیل بنزیدین(**TMB**)، آنزیم رنگ آبی ایجاد می کند. با اضافه نمودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می شود. شدت رنگ ایجاد شده که با غلظت Free T4 نمونه ارتباط معکوس دارد، در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) اندازه گیری می گردد.

توجه و احتیاط

- این کیت تشخیصی به صورت *in vitro* قابل استفاده می‌باشد.
- اجزای اختصاصی این کیت برای مصرف با اجزای هم سری ساخت کیت ارائه شده‌اند.
- اجزای عمومی کیت شامل محلول‌های شستشو، رنگ زا و متوقف‌کننده می‌باشند که برای سایر محصولات دیازیست نیز قابل استفاده هستند.
- جهت کاهش پدیده تأخیری، ضرورت دارد زمان انجام مرحله اول تست در کمتر از ۱۰ دقیقه انجام شود.
- توصیه می‌شود در هر تست استانداردها جهت رسم منحنی استفاده شوند، همچنین درصورتی که همزمان بیش از یک پلیت تست گذاشته شود، رسم منحنی برای هر پلیت ضروری است.
- کالیبره بودن ابزارها و دستگاه‌ها در صحت نتایج اثر گذار است.
- جهت ساخت اجزای این کیت از مواد شیمیایی و زیستی استفاده شده است. لذا توصیه می‌شود هنگام کار از تماس مستقیم با مواد پرهیز شود.

محتویات کیت

اجزای تشکیل دهنده کیت ۹۶ تستی Free T4 به شرح زیر می باشد:

ردیف	نام اجزاء	مقدار/تعداد
۱	پلیت پوشانده شده با آنتی‌بادی مونوکلنال ضد T4 (Anti- T4 Antibody Coated Microtiter Plate)	1/96 wells
۲	استانداردهای A-F (Standards A-F) برحسب (ng/dl) (ng/dl × 12.872= pmol/L)	6/1 ml
۳	کنترل پایین و بالا (Controls Low & High)	2/1 ml
۴	محلول شستشوی غلیظ (Concentrated Wash Buffer)	1/25 ml
۵	محلول رقیق کننده آنزیم کونژوگه (Tracer Diluent)	1/12 ml
۶	محلول غلیظ آنزیم (HRP) کونژوگه شده به T4 (T4 -HRP Conjugate)	1/1.2 ml
۷	محلول رنگ زا (TMB Substrate)	1/12 ml
۸	محلول متوقف‌کننده (Stop Solution)	1/12 ml

شرایط نگهداری و پایداری

- کیت را در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد نگهداری کنید.
- پایداری کیت در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد، قبل از شروع استفاده (In Shelf) و حین استفاده(In use) بر مبنای استاندارد CLSI (EP25 -A) [۸] بررسی گردید که نتایج به شرح زیر می‌باشد:

قبل از شروع استفاده (In Shelf)	تا پایان تاریخ انقضا
حین استفاده (In use)	تا ۶ ماه

جمع آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه مورد نیاز جهت اندازه‌گیری Free T4، سرم یا پلاسمای به‌دست آمده با مواد ضد انعقاد هپارین، سیترات سدیم و EDTA می‌باشد. جهت پایداری نمونه‌ها از سدیم ازاید(Sodium Azide) استفاده نشود. نمونه ها در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد تا ۷ روز و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا یک ماه قابل نگهداری هستند. [۹] از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه‌ها پرهیز نمایید. جهت اندازه‌گیری Free T4 نمونه‌های منجمد شده، ابتدا نمونه را در دمای اتاق ذوب و بعد با حرکت دست یکنواخت نمایید.

مواد و وسایل لازم که همراه کیت عرضه نمی شوند

- دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ و۶۳۰ نانومتر کالیبر شده
- سمپلرهای ۱۰۰ و ۲۵ میکرولیتر کالیبر شده
- سرسمپلرهای یک‌بار مصرف
- آب مقطر برای رقیق سازی محلول شستشوی غلیظ

روش انجام تست

قبل از انجام تست:

- تمام مواد و نمونه ها را به دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد) برسانید.
- برای تهیه محلول کونژوگه مصرفی، **یک** حجم محلول کونژوگه غلیظ را با **۱۰** حجم محلول رقیق کننده کونژوگه مخلوط نمایید.
- برای تهیه محلول شستشوی قابل مصرف، **یک** حجم محلول شستشوی غلیظ(20x) را با **۱۹** حجم آب مقطر رقیق نمایید.

مراحل انجام تست :

۱. ۲۵ میکرولیتر از هر استاندارد، کنترل و نمونه سرم به چاهک مربوطه بریزید. سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول آنزیم کونژوگه اضافه نموده و پلیت را روی میز **۱۵** ثانیه تکان دهید تا به خوبی مخلوط شوند.

۲. روی چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پوشانده و مدت **۶۰** دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.

۳. چاهک‌ها را **۴** بار با **۳۰۰** میکرولیتر محلول شستشو بشویید.

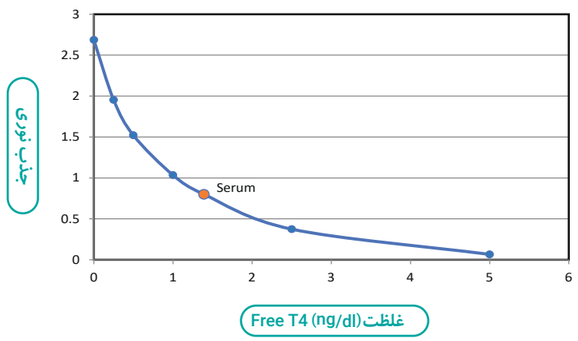
۴. به هر چاهک **۱۰۰** میکرولیتر محلول رنگ زا اضافه نمایید و پلیت را به مدت **۲۰** دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.

۵. به هر چاهک **۱۰۰** میکرولیتر محلول متوقف کننده اضافه نمایید و بعد از مخلوط کردن به مدت **۱۵** ثانیه، میزان جذب نوری را در طول موج **۴۵۰** نانومتر با دیفرانسیل **۶۳۰** نانومتر، حداکثر تا **۱۵** دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، بخوانید.

محاسبه نتایج

غلظت Free T4 نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد (رسم به‌صورت دستی یا دستگاه الایزا ریدر) تعیین می‌گردد. در این منحنی جذب نوری استانداردها را در طول موج **۴۵۰** نانومتر بر روی محور عمودی (Y) و غلظت آن‌ها را بر حسب **ng/dl** بر روی محور افقی (X) مشخص کنید و بر اساس آن منحنی را رسم نمایید. با استفاده از منحنی ترسیم شده و جذب نوری بدست آمده از نمونه، غلظت Free T4 آن قابل محاسبه می‌باشد. جدول و نمودار زیر به عنوان مثال ارائه شده است.

نمونه	جذب نوری	میانگین جذب نوری	غلظت Free T4 (ng/dl)
استاندارد A	۲/۷۰۴	۲/۶۸۵	۰
	۲/۶۶۶		
استاندارد B	۱/۹۸۲	۱/۹۵۴	۰/۲۵
	۱/۹۲۷		
استاندارد C	۱/۵۲۲	۱/۵۲۰	۰/۵
	۱/۵۱۸		
استاندارد D	۱/۰۴۲	۱/۰۳۴	۱
	۱/۰۲۵		
استاندارد E	۰/۳۸۴	۰/۳۷۴	۲/۵
	۰/۳۶۳		
استاندارد F	۰/۰۶۴	۰/۰۶۶	۵
	۰/۰۶۸		
کنترل پایین	۱/۹۶۳	-	۰/۲۶
کنترل بالا	۰/۳۷۱	-	۲/۵۲
سرم	۰/۸۵۹	-	۱/۳۹



کنترل کیفی

تست در صورتی تأیید می‌گردد که:

- جذب نوری استاندارد صفر بیش از **۱/۴** باشد.
- خوانش کنترل‌های پایین و بالای کیت در محدوده مورد قبول باشد.
- توصیه می‌گردد جهت حصول اطمینان از نتایج کیت، علاوه بر کنترل‌های ارائه شده در کیت، به صورت دوره‌ای از کنترل‌های دقت و صحت تجاری نیز استفاده گردد. بدیهی است نتایج بدست آمده بایستی در محدوده مورد قبول قرائت گردد.

تداخل‌ها و محدودیت‌ها

- جهت بررسی اختصاصیت آنتی بادی به کار رفته در این کیت، اثر تداخلی آنالیتهای هورمونی قید شده در جدول زیر بررسی گردید. درصد تداخل نسبت غلظت Free T4 به ماده افزوده شده است که جایگزین ۵۰٪ واکنشهای T4-HRP با آنتی بادی ضد T4 گردیده است. بنا به نتایج مندرج در جدول زیر اثر تداخل آنالیت های افزوده شده قابل توجه نمی باشد.

ماده افزوده شده	درصد تداخل(Cross-reactivity)
d-Triiodothyronine	<۰/۱
L-Triiodothyronine	<۰/۱
Iodothyrosine	<۰/۱
Diiodothyrosine	<۰/۱
Diiodothyronine	<۰/۱

- اثر تداخلی بیلی روبین (تا ۲۰ mg/dl)، هموگلوبین (تا ۵۰۰ mg/dl)، تری‌گلیسرید (تا ۳۰۰۰ mg/dl) و فاکتورهای روماتوئید(تا ۲۵۰۰ IU/ml) در سرم کمتر از **۵٪** می باشد.
- نمونه سرم یا پلاسمای افرادی که سابقه درمان یا تشخیص بیماری با مواد حاوی آنتی‌بادی مونوکلنال موش داشته‌اند، می‌تواند حاوی آنتی بادی‌های انسانی ضد موش (HAMA) باشد. با توجه به غلظت آنتی‌بادی و مواد بازدارنده مورد استفاده در این کیت، واکنش‌های تداخلی غیر اختصاصی به حداقل رسیده و تا کنون واکنش مثبت کاذب مشاهده نشده است.
- محدوده قابل اندازه‌گیری غلظت Free T4 با این کیت، ۱۰- ng/dl ۰/۱ می‌باشد.

مقادیر طبیعی

دامنه مقادیر طبیعی با اندازه گیری غلظت سرمی FT4، ۲۹۶ فرد بالغ سالم (euthyroid) تعیین گردید. بنا به نتایج بدست آمده غلظت سرمی FT4 این افراد در محدوده ng/dl ۱/۸-۰/۷ با میانگین ng/dl ۱/۴ است.
توصیه می گردد هر آزمایشگاه با اندازه گیری غلظت Free T4 افراد سالم، مقادیر طبیعی مرجع خود را تعیین و از آن برای تفسیر نتایج استفاده نماید.

ویژگی‌های اختصاصی کیت

۱. حساسیت: حداقل غلظت قابل اندازه گیری Free T4 که از نمونه فاقد آنالیت قابل تمایز باشد را حساسیت گویند. این مقدارکه بر اساس میانگین غلظت استاندارد صفر بعلاوه دو برابر انحراف معیار محاسبه گردیده است (**بدست آمده از ۱۰ تست**)، ng/dl ۰/۱ می‌باشد.

۲. صحت: غلظت Free T4، ۲۲۸ نمونه تصادفی با کیت دیازیست و روش مرجع (ELFA) اندازه‌گیری شد. نتایج بدست‌آمده از مقایسه دو روش ضریب همبستگی خطی (r) ۰/۹۸ را نشان می‌دهد. غلظت نمونه‌ها با کیت دیازیست بین ng/dl ۰/۳۱ تا ۵/۷۹ و با روش مرجع ng/dl ۰/۳۱ تا ۵/۹۹ بود. نتایج مقایسه دو روش به شرح زیر است:

روش	تعداد نمونه	غلظت نمونه‌ها (ng/dl)	Intercept	Slope
Passing/Bablok	۲۲۸	۰/۳-۶	۰/۰۱	۰/۹۸
Linear Regression	۲۲۸	۰/۳-۶	۰/۰۱	۰/۹۹

۳. دقت: شاخص دقت این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP5-A2) [۱۰] ارزیابی گردیده است. بدین منظور میزان Free T4، **۳** نمونه سرمی با غلظت‌های مختلف اندازه‌گیری و انحراف معیار و ضریب تغییرات محاسبه گردید که در جدول زیر آمده است:

شماره نمونه	تعداد سنجش	میانگین غلظت (ng/dl)	Within Run		Total	
			SD	٪CV	SD	٪CV
۱	۶۰	۰/۶۰	۰/۰۲	۳/۰۸	۰/۰۲	۳/۹۰
۲	۶۰	۱/۶۰	۰/۰۷	۳/۸۵	۰/۰۸	۴/۹۶
۳	۶۰	۴/۷۳	۰/۲۳	۴/۸۱	۰/۲۴	۴/۹۹

۴. خطی بودن: به منظور بررسی صحت اندازه‌گیری نمونه‌های با غلظت بالای ULoQ (upper limit of quantitation) تست خطی بودن این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP34)[۱۱] انجام گردید. بدین منظور نمونه سرم با غلظت **۴/۹۸ ng/dl** با پلاسمای انسانی فاقد T4 (Depleted Plasma) به صورت متوالی رقیق شد. سپس غلظت‌ها با کیت Free T4 اندازه‌گیری گردید. درصد ریکاوری رقت که شاخص میزان دقت رقت‌گیری می باشد، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\frac{\text{غلظت اندازه‌گیری شده (ng/dl)}}{\text{غلظت مورد انتظار (ng/dl)}} \times ۱۰۰$$

(محدوده درصد ریکاوری بدست آمده بین ۹۵/۲ تا ۱۰۶/۴ است)

٪ ریکاوری	غلظت اندازه گیری شده (ng/dl)	غلظت مورد انتظار (ng/dl)	رقت
۱۰۲/۸	۲/۵۶	۲/۴۹	۱:۲
۹۸/۴	۱/۲۳	۱/۲۵	۱:۴
۹۵/۲	۰/۵۹	۰/۶۲	۱:۸
۱۰۶/۴	۰/۳۳	۰/۳۱	۱:۱۶

۵. بازیابی: به‌منظور بررسی اثر ماتریکس، تست بازیابی این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP34)[۱۱] انجام گردید. بدین منظور مقادیر متفاوتی از نمونه حاوی Free T4 با غلظت بالا (**۵/۲۱ng/dl**) به نمونه مورد بررسی حاوی Free T4 با غلظت پایین (**۱/۴۷ng/dl**) افزوده شد. سپس غلظت نمونه‌ها با کیت Free T4 اندازه‌گیری گردید و درصد ریکاوری که شاخص میزان دقت بازیابی می‌باشد، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\frac{a-b}{c} \times 100$$

a: غلظت اندازه‌گیری‌شده نمونه مورد بررسی بعد از افزودن آنالیت
b: غلظت اندازه‌گیری‌شده نمونه مورد بررسی بعد از افزودن محلول رقیق‌کننده
C: غلظت آنالیت افزوده شده

(درصد ریکاوری بدست آمده بین ۹۶/۰ تا ۱۰۴/۳ است)

٪ ریکاوری	c (ng/dl)	b (ng/dl)	a (ng/dl)
۹۶/۰	۰/۲۵	۱/۵۰	۱/۷۴
۱۰۴/۳	۰/۴۷	۱/۴۳	۱/۹۲
۱۰۱/۱	۰/۸۷	۱/۳۱	۲/۱۹
۹۶/۶	۱/۴۹	۱/۱۲	۲/۵۶

منابع

1. Visser T.J. Oxford Textbook of Endocrinology and Diabetes. Chapter:Biosynthesis, transport, metabolism, and actions of thyroid hormones, Second edition, 2011.
2. DeRuiter J. Thyroid hormone tutorial: the thyroid and thyroid hormones. Endocrine Pharmacotherapy Module: Thyroid Section, Summer, 2001.
3. Kim HY., Mohan S. Role and Mechanisms of Actions of Thyroid Hormone on the Skeletal Development. Bone Research.2: 146-61, 2013.
4. Woeber KA, Ingbar SH. The Contribution of Thyroxine-Binding Prealbumin to the Binding of Thyroxine in Human Serum, as Assessed by Immunoadsorption. J Clin Invest. 47:1710-1721,1968.
5. Mondal S, *et al*. Chemistry and Biology in the Biosynthesis and Action of Thyroid Hormones. Angew Cheme In Engl. 55(27):7606-30, 2016.
6. Epocrates. Thyroid function testing, 2018.
7. Szpunar WE, *et al*. Clinical Evaluation of a Thyroxine-Binding Globulin Assay in Calculating a Free-Thyroxine Index. J Nucl Med. 22:793-795, 1981.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Stability of *In Vitro* Diagnostic Reagents; Approved Guideline – First Edition. NCCLS Document EP25-A. 2009.
9. Wu AHB. Tietz Clinical Guide To Laboratory Tests. Saunders Elsevier, Philadelphia, 4th edition, section II, p. 1046-1048, 2006.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline – Second Edition. NCCLS Document EP5-A2. 2004.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Establishing and Verifying an Extended Measuring Interval Through Specimen Dilution and Spiking – First Edition. EP34. 2018.

تهران،خیابان سهروردی شمالی،خیابان افشار جوان،پلاک ۲، واحد ۱۰
تلفن ویژه: ۷۲۴۵۷-۰۲۱
office@garnimed.com
www.garnimed.com

Published: Dec. 2018