

کیت اندازه گیری T-Uptake در سرم انسان
T-Uptake ELISA Kit
 96 Tests / Cat. No: 1324-96
 192 Tests / Cat. No: 2224-192
 Rev: A3 (1402/09/22)

مقدمه:

غلظت هورمون های تیروئیدی آزاد موجود در خون ارتباط معکوسی با سطح پروتئین های حامل این هورمون ها دارد. سه نوع از پروتئین ها با ظرفیت و تمایل متفاوت برای اتصال به T3 و T4 شناخته شده اند. گلوبولین متصل شونده به تیروکسین (TBG)، ۶۵ تا ۷۵ درصد از هورمون های تیروئید را در خون حمل می کند. پره آلبومین متصل شونده به تیروکسین (TBPA) و آلبومین نیز به میزان کمتری به هورمون های تیروئیدی متصل می شوند. درصد بسیار کمی از تیروکسین به صورت آزاد در خون بدون پیوند باقی می ماند. در برخی شرایط پاتولوژیک، غلظت پروتئین های سرم افزایش می یابد که منجر به افزایش غلظت کل هورمون های تیروئید (به ویژه T4) می شود، در حالی که عملکرد تیروئید طبیعی است. تعیین میزان T-Uptake همراه با تعیین مقدار کل هورمون های تیروئید در شرایط خاص، شاخص بهتری برای ارزیابی عملکرد تیروئید است. حیطة کاربرد این کیت، اندازه گیری کمی سطح T-Uptake در نمونه سرم یا پلاسما انسان به روش ایزا است.

اصول آزمایش:

این تست بر پایه ایزای رقابتی طراحی شده است. محلول کونژوگه آنزیمی حاوی T4 آزاد و T3 کونژوگه شده با آنزیم HRP می باشد. پروتئین های حامل هورمون های تیروئیدی در سرم (بر اساس ظرفیت اتصال هر پروتئین) به مقداری از T4 آزاد موجود در معرف آنزیمی متصل می شوند ولی قابلیت اتصال به T3 کونژوگه شده با آنزیم HRP را ندارند. بخشی از T4 آزاد که به پروتئین های حامل متصل نشده است، برای اتصال به آنتی بادی تثبیت شده در سطح چاهک، با T3 کونژوگه رقابت می کند. پس از تخلیه و شستشوی چاهک ها، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی تولید می شود که بیشترین جذب نوری را در طول موج

۴۵۰ نانومتر دارد. در نهایت، میزان T-Uptake سرم به کمک منحنی استاندارد محاسبه می گردد.

محتویات کیت:

محتویات کیت	کیت ۹۶ تستی	کیت ۱۹۲ تستی
میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی آنتی بادی تثبیت شده ضد تیروکسین.	یک عدد	دو عدد
کالیبراتورها (T-Uptake Cal A-D)، چهار ویال با غلظت های درج شده بر روی لیبل ویال آن ها.	یک سری ویال با غلظت های متفاوت	یک سری ویال با غلظت های متفاوت
کونژوگه آنزیمی (Enzyme Conjugate)	یک ویال ۱/۵ میلی لیتری	یک ویال ۲/۵ میلی لیتری
محلول رقیق کننده کونژوگه (Conjugate Diluent)	یک ویال ۱۱ میلی لیتری	دو ویال ۱۱ میلی لیتری
محلول شستشو (Wash Solution-50X)	یک ویال ۲۰ میلی لیتری	یک ویال ۲۰ میلی لیتری
محلول رنگزا A (Substrate Solution A)	یک ویال ۶/۵ میلی لیتری	دو ویال ۶/۵ میلی لیتری
محلول رنگزا B (Substrate Solution B)	یک ویال ۶/۵ میلی لیتری	دو ویال ۶/۵ میلی لیتری
محلول متوقف کننده واکنش (Stop Solution)	یک ویال ۱۲ میلی لیتری	یک ویال ۱۲ میلی لیتری
برجسب مخصوص پلیت	یک ورق	دو ورق

توجه: غلظت کالیبراتورها در هر سری تولید مطابق با مقادیر درج شده بر روی لیبل آن ها و گواهی آنالیز محصول (COA) می باشد. تمام محلول ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند:

- دستگاه خوانش گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
- سپمپلر کالیبره.
- آب مقطر دیونیزه.

احتیاط در استفاده از کیت:

۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است لذا از استفاده مشترک با سایر کیت ها و یا شماره های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.

۲) کلیه محلول ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول هایی که تاریخ انقضاء آن ها گذشته است استفاده نکنید.

۳) توجه فرمایید محلول ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.

۴) محتویات این کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2، HBSAg و HCV بررسی شده اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری زا با استفاده از روش های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین با توجه به احتمال آلودگی و بیماری زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل های ایمنی انجام شوند.

۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود و از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری نمایید.

۶) نمونه بیماران، کنترل ها، چاهک ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

۱) نمونه مناسب برای این تست سرم یا پلاسما است. از هپارین یا EDTA برای نمونه های پلاسما استفاده نمایید. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه گیری در درستی نتایج به دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول های خونی جدا گردد. حتی الامکان از نمونه های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.

۲) درب ظرف نمونه ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قابل نگهداری هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه ها خودداری کنید.

آماده سازی معرف ها:

۱) آماده سازی محلول کونژوگه آنزیمی: محلول کونژوگه آنزیمی را با محلول رقیق کننده کونژوگه، به نسبت ۱:۱۰ رقیق کنید. برای مثال

۲۰۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی را به ۲ میلی لیتر محلول رقیق کننده کونژوگه اضافه کنید. این محلول برای ۲۰ چاهک قابل استفاده است. محلول آماده شده در طی ۲۴ ساعت باید مورد استفاده قرار گیرد.

۲) آماده سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.

۳) آماده سازی محلول رنگزا: محلول های رنگزا A و B را با حجم های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی لیتر از محلول رنگزا B اضافه کنید) و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

روش انجام آزمایش:






قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که دمای تمام اجزاء کیت، کنترل ها و نمونه ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی گراد) رسیده اند کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید

۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک ها را همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید.

۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها و نمونه ها در چاهک های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک ها ریخته شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی آماده مصرف (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

EC REP	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
LOT	Batch code
IVD	In vitro diagnostic medical device
CE	European conformity
REF	Catalogue number
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

1. McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
2. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
3. Tietz. Reference information for the clinical laboratory. Hn Textbook of clinical chemistry. Burtis, CA, Ashwood, RA, WB, Saunders. Philadelphia; 1999.

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

(۲) بررسی دقت - آزمون دقت بین دور (Between-Run)

دقت بین دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean T-Uptake (%U)	19.34	23.56	41.27
SD (%U)	1.01	1.14	1.64
CV (%)	5.2	4.8	4.0

(۳) بررسی درستی - آزمون مقایسه روش‌ها
(Comparison of Methods)

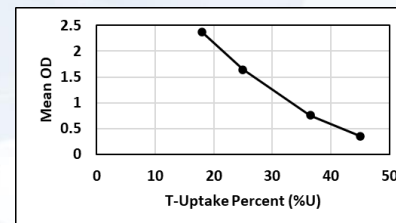
جهت بررسی درستی نتایج این کیت، میزان T-Uptake در ۵۰ نمونه سرم با مقادیر پایین، نرمال و بالا توسط این کیت اندازه‌گیری شد و نتایج آن با کیت مرجع مقایسه و ضریب همبستگی بین نتایج به دست آمده از دو کیت، بر اساس روش پیروسون ۰/۹۸۲ محاسبه گردید. معیار پذیرش برای این آزمایش به صورت زیر تعریف شده است:

$$0.9 \leq \text{Pearson Correlation Coefficient} \leq 1.0$$

(۴) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.
In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد. مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.


مقادیر مورد انتظار برای تست T-Uptake به روش الیزا

شرکت تولید کننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه این مقادیر باید برای آنالیت مورد نظر توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

Expected Range	
Thyroid Status	T-Uptake (%U)
Euthyroid	25 - 35
Hypothyroid or TBG excess binding	< 25
Hyperthyroid or TBG saturation	> 35

پارامترهای کنترل کیفی
(۱) بررسی دقت - آزمون دقت درون دور (Within-Run)

دقت درون دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean T-Uptake (%U)	17.21	26.53	37.19
SD (%U)	0.84	1.14	1.35
CV (%)	4.9	4.3	3.6

(۴) چاهک‌ها را با چسب مخصوص پلیت بیوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

(۵) محتویات پلیت را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده مصرف، (بخش آماده سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت اقدام نمایید.

(۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده مصرف (بخش آماده سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

(۷) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

(۸) مقدار جذب را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج فرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	T-Uptake (%U)
Cal. A	A1	2.341	2.370	18
	B1	2.399		
Cal. B	C1	1.628	1.643	25
	D1	1.659		
Cal. C	E1	0.721	0.757	36.5
	F1	0.794		
Cal. D	G1	0.329	0.349	45
	H1	0.369		