دیاپلاس

DIAPLUS

DiaPlus

کیت ۱۹۲ تستی اندازه‌گیری T4 به روش الایزا

Brochure Rev: A1 (1402/04/24)

REF 1944-192

اهمیت بالینی

هورمون تیروکسین (T4) از غده‌ی تیروئید ترشح می شود و اصلی‌ترین عملکرد آن کنترل فعالیت متابولیکی سلول می‌باشد. T4 به طور نسبی غیرفعال بوده و در کبد و دیگر بافت‌های محیطی به T3 (نوع فعال هورمون تیروئید) تبدیل می‌گردد. هورمون‌های تیروئیدی باعث افزایش سرعت متابولیسم پایه، افزایش دمای بدن و افزایش سنتز پروتئین‌ها می‌شود و برای تکامل و رشد سلول‌ها و اعضای بدن به ویژه در دوران جنینی و کودکی ضروری هستند. اندازه‌گیری میزان T4 توتال به روش ایمونواسی، آسان‌ترین و مطمئن‌ترین تست جهت تشخیص نارسایی‌های تیروئید است. افزایش مقدار T4 در هیپرتیروئیدیسم، بیماری‌های Graves و تیروئیدیت‌های حاد رخ می‌دهد. مقدار پایین T4 نیز در هیپوتیروئیدیسم‌های مادرزادی، Myxedema، تیروئیدیت‌های مزمن (بیماری هاشیموتو) و یا دیگر نارسایی‌های ژنتیکی دیده می‌شود. حیطه کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی غلظت تیروکسین در سرم یا پلاسما انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش

اساس این تست الایزای رقابتی می‌باشد. در این آزمایش T4 کونژوگه (متصل به آنزیم HRP) به‌همراه نمونه سرم (یا کالیبراتور) حاوی T4 طبیعی (غیرکونژوگه)، به چاهک‌های حاوی آنتی‌بادی تثبیت شده اضافه می‌شوند. در زمان انکوباسیون رقابت بین T4 موجود در نمونه و T4 نشان‌دار برای اتصال به آنتی‌بادی‌های تثبیت شده در ته چاهک صورت می‌گیرد. پس از شستشوی چاهک‌ها، با اضافه کردن محلول سوبسترای آنزیم HRP، رنگ آبی تشکیل شده که با افزودن محلول متوقف‌کننده تبدیل به رنگ زرد می‌گردد. محصول نهایی تولید شده در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. شدت رنگ ایجاد شده و در نتیجه میزان جذب، با غلظت T4 موجود در نمونه‌ها و کالیبراتورها نسبت عکس دارد. در نهایت غلظت T4 موجود در نمونه‌ها توسط منحنی استاندارد (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت

۱) کالیبراتورها (Cal A-F) ۰/۷۵میلی‌لیتر:

شامل ۶ ویال کالیبراتور با غلظت‌های ۰ , ۲ , ۵ , ۱۰ , ۱۵ , ۲۵ µg/dL

نکته : کالیبراتورها بر پایه سرم انسانی تهیه شده.

۲) محلول کونژوگه آنزیمی (T4 Enzyme Conjugate) ۳ میلی‌لیتر:

یک ویال شامل محلول T4 نشان دار شده با آنزیم.

۳) محلول بافر کونژوگه (Conjugate Buffer) ۱۲ میلی‌لیتر:

دو ویال شامل بافر کونژوگه.

۴) پلیت ۹۶ تستی :

دو پلیت حاوی آنتی‌بادی ضد T4 تثبیت‌شده که به‌همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی بسته‌بندی شده است.

۵) محلول شستشو غلیظ (Wash Buffer-50X) ۲۰ میلی‌لیتر:

یک ویال شامل سورفاکتانت محلول شده در بافر فسفات.

۶) محلول سوبسترا A (Substrate Solution A) ۶/۵ میلی‌لیتر:

دو ویال محلول تترا متیل بنزیدین (TMB).

۷) محلول سوبسترا B (Substrate Solution B) ۶/۵ میلی‌لیتر:

دو ویال محلول هیدروژن پراکساید (H_2O_2).

۸) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution) ۱۲ میلی‌لیتر:

یک ویال حاوی محلول متوقف کننده واکنش.

۹) سرم کنترل (T4 Control):

ویال(های) حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر سرم کنترل .

۱۰) برچسب مخصوص پلیت:

دو ورق.

توجه ۱: کلیه اجزای کیت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود. محلول متوقف‌کننده را می‌توان در دمای اتاق نگهداری کرد.

توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در برگه COA درج شده است.

موارد احتیاط در استفاده از کیت

- این کیت برای انجام تست‌های تشخیصی در محیط‌های آزمایشگاهی کاربرد دارد. محتویات کیت منشأ سرم انسانی داشته و از نظر عدم وجود HBsAg و آنتی‌بادی‌های ضد HIV1/2 و HCV کنترل شده‌اند، اما از آنجا که هیچ روشی به طور صد در صد نمی‌تواند منفی بودن این موارد را تأیید نماید، بنابراین لازم است هنگام استفاده از کیت، مراقبت های لازم به عمل آورده شود.
- محتویات تعبیه شده در این کیت برای استفاده در همین سری ساخت بوده و از استفاده مشترک با سایر سری ساخت‌ها خودداری فرمایید.
- برای دریافت نتایج بهتر و دقیق‌تر فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ چاهک‌ها رعایت شود. این فاصله زمانی نباید به گونه ای باشد که منجر به اثر دریفت (drift) گردد. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل این نکته حائز اهمیت است. دقت نمایید محلول‌ها نزدیک به ته چاهک ریخته شوند.
- شستشوی نامناسب می‌تواند باعث بوجود آمدن نتایج اشتباه در آزمایش شود.
- کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از استفاده از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است خودداری نمایید.

جمع آوری و تهیه نمونه ها

- نمونه مورد استفاده در این آزمایش سرم یا پلاسما (حاوی هپارین یا EDTA) می‌باشد که از خون سیاهرگی تهیه شده و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا می‌گردد. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
- نگهداری سرم باید در لوله های در بسته انجام شود. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری می‌باشد و در صورت استفاده برای مدت زمان طولانی‌تر (حداکثر تا ۳۰ روز) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.

آماده‌سازی محلول‌ها

- **محلول شستشو:** کل حجم ویال محلول شستشو (50X) را با ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید. محلول آماده شده در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.
- **محلول سوبسترا:** محلول‌های سوبسترا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول سوبسترا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول سوبسترا B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول سوبسترا، از مصرف آن خودداری فرمایید.
- **محلول کونژوگه آنزیمی T4:** محلول کونژوگه آنزیمی را با بافر کونژوگه به نسبت ۱:۱۰ رقیق کنید. به‌عنوان مثال، برای ۱۰ چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر کونژوگه غلیظ به ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر کونژوگه اضافه نمایید. این محلول باید به صورت روزانه آماده شود و زمان پایداری آن پس از آماده سازی ۲۴ ساعت می باشد.

مراحل انجام تست

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کلیه ویال‌های کالیبراتور، کنترل و نمونه‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت نمایید.

۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام آزمایش را جدا نموده و چاهک‌های باقی مانده به همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده، درب آن را ببندید و در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم **۲۵** میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌های بیمار و کنترل را در داخل چاهک های مورد نظر بریزید. پیشنهاد می‌شود از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود و از میانگین جذب نوری آنها استفاده شود.

۳)حجم **۱۰۰** میکرولیتر محلول کونژوگه آماده شده (بخش آماده سازی محلول‌ها را مطالعه بفرمایید) به تمامی چاهک‌ها اضافه کنید. پلیت را ۳۰- ۲۰ ثانیه به آرامی روی سطح میز تکان دهید.

۴) پلیت را با برچسب بپوشانید و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک‌ها را در روش دستی با وارونه کردن پلیت و در روش دستگاهی با آسپیره کردن کاملا تخلیه نمایید.

۶) چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده سازی محلول‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

۷) حجم **۱۰۰** میکرولیتر از محلول سوبسترا آماده شده (به بخش آماده سازی محلول‌ها مراجعه شود) به چاهک ها اضافه نمایید و با برچسب پلیت بپوشانید. سپس پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای

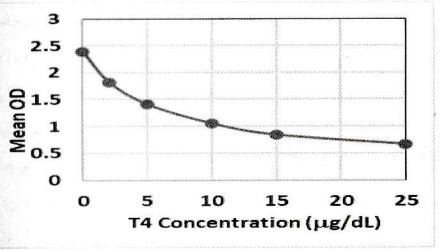
اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری فرمایید.

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

۸) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به چاهک‌ها اضافه نموده و به مدت ۲۰-۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید.

۹) جذب نوری چاهک ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با روش Point to Point در کمتر از ۱۵ دقیقه بخوانید. از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده نمایید.

Calibrators	Well Number	Abs	Mean Abs	Conc. (µg/dL)
Cal. A	A1	2.381	2.392	0
	B1	2.403		
Cal. B	C1	1.878	1.894	2
	D1	1.911		
Cal. C	E1	1.488	1.494	5
	F1	1.501		
Cal. D	G1	1.033	1.04	10
	H1	1.048		
Cal. E	A2	0.776	0.788	15
	B2	0.801		
Cal. F	C2	0.622	0.631	25
	D2	0.641		



نکته: جذب نوری به دست آمده از کالیبراتورها و همچنین منحنی فوق فقط به عنوان مثال ذکر شده و در هر آزمایشگاهی در هر مرتبه آزمایش باید منحنی جدیدی ترسیم گردد.

مقادیر مورد انتظار

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

Normal Range For Adults
4.5 – 12.5 µg/dL

پارامترهای کنترل کیفی

Intra – Assay

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean T4 (µg/dL)	4.9	9.3	14.2
SD. (µg/dL)	0.27	0.44	0.61
C.V. (%)	5.5	4.7	4.3

Inter – Assay

دقت بین‌تستی یا ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با غلظت‌های متفاوت در چهار نوبت کاری (هر نوبت پنج بار تکرار) بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean T4 (µg/dL)	3.9	7.7	16.9
S.D. (µg/dL)	0.23	0.36	0.76
C.V. (%)	5.8	4.6	4.4

Recovery

در این تست دو نمونه سرم به‌نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به‌عنوان یک نمونه، مقدار T4 در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش، Bias<10% نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

NO.	Sample (µg/dL)	Added (µg/dL)	Exp. (µg/dL)	Obs. (µg/dL)	% Rec
1	11.7	5.3	8.5	7.99	94
2	4.4	17.3	10.85	10.94	100.8
3	10.3	16.3	13.3	14.1	106

Linearity

در این تست، غلظت T4 در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش Bias<10% است.

No.	Sample (µg/dL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	4.1	2.5	-2.8	-2.1	-3.1
2	8.3	-1.9	3.3	-1.7	-2.4
3	14.6	-1.3	-1.4	-2.8	-1.6

Cross Reactivity

اختصاصیت این آزمایش با اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مداخله‌گر به سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین دوز ماده مداخله‌گر به دوز T4 مورد نیاز برای همان مقدار جذب ارزیابی شد. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده ۱۰±۱۰۰ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Analyts	Cross Reeactivity	Concentration
L-Thyroxin	1	-
D-Thyroxin	0.9800	10 µg/dL
D-Thriiodothyronine	0.0150	100 µg/dL
L-Thriiodothyronine	0.0300	100 µg/dL
Iodothyrosine	0.0001	100 µg/mL
Diiothyrosine	0.0001	100 µg/mL
Diiodothyronine	0.0001	100 µg/mL

Sensitivity

بر اساس جمع میانگین جذب نوری کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف معیار حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت ۰/۱۵ µg/dL می باشد.

منابع

1. Barker, S.B., "Determination of Protein Bound Iodine." *Journal Biological Chemistry* 173-175. (1948).
2. Chopra, I.J., Solomon, D.H., an Ho, R.S., "A Radioimmunoassay of Thyroxine," *J. Clinical EndocrinoL* 33, 865. (1971)
3. Young, D.S., Pestaner, L.C., and Gilberman, U., "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests." *Clinical Chemistry* 21, 3660. (1975)
4. Sterling, L., Diagnosis and Treatment of Thyroid Disease, Cleveland *CRC Press* P. 19-51. (1975)
5. Rae P, Farrar J, Beckett G, Toft A, 'Assessment of thyroid status in elderly people.' *British Med. Jour* 307, 177-180. (1993)
6. Charkes ND, "The many causes of subclinical hyperthyroidism." *Thyroid* 6, 391-396. (1996)
7. Chou FF, Wang PW, Huang SC, 'results of Subtotal Thyroidectomy for Graves' disease.' *Thyroid* 9, 253-256.
8. Muzzaffari EL, Gharib H, "Thyroxine suppressive therapy in patients with nodular thyroid disease." *Ann Intern Med* 128, 386-394. (1998)
9. Attwood EC, Seddon RM, Probert DE: "The T4/TBG ratio and the investigation of thyroid function." *Clin Biochem* 11, 218. (1978)
10. Jain R, Isaac RM, Gottschalk ME et al: I'Transient central hypothyroidism as a cause of failure to thrive in newborns and infants.' *J.* Endocrinology Invest 17, 631-637. (1994)

در صورت بروز هرگونه مشکل با بخش پشتیبانی شرکت تینا پژوهان آروین تماس حاصل فرمایید.

IVD

DIAPLUS
شرکت تینا پژوهان اروین
سهروردی شمالی ، پایین تر از آپادانا،
کوچه فیروزه، پلاک ۳ واحد ۱ و ۲
تلفن: ۰۲۱-۴۱۷۹۶۰۰۰