

کیت اندازه گیری هورمون T4 در سرم انسان
T4-S ELISA Kit
192 Tests: Cat. No: 10424-192
Rev: C1 (1405/06/22)

مقدمه:

تیروکسین (T4) اصلی ترین هورمون ترشح شده از فولیکول های غده تیروئید است. حدود ۷۰ درصد از T4 موجود در خون با گلوبولین متصل شونده به تیروکسین (TBG)، ۲۰ درصد با پره آلبومین متصل شونده به تیروکسین و ۱۰ درصد با آلبومین پیوند برقرار می کند و حدود ۰/۰۳ درصد از T4 نیز به صورت آزاد در خون جریان دارد. T4 به عنوان پیش ساز و ذخیره هورمون فعال تیروئید (T3)، با دیدینه شدن در بافت ها به T3 تبدیل می شود که فعالیتی بسیار بیشتر از T4 دارد. اندازه گیری میزان T4 توتال به روش ایمونواسی، تستی آسان و مطمئن جهت تشخیص نارسایی های تیروئید است. افزایش مقدار T4 در هیپرتیروئیدیسم، بیماری های Graves و تیروئیدیت های حاد رخ می دهد. مقدار پایین T4 نیز در هیپوتیروئیدیسم های مادرزادی، Myxedema، تیروئیدیت های مزمن (بیماری هاشیموتو) و یا دیگر نارسایی های ژنتیکی دیده می شود. حیطه کاربرد این کیت، اندازه گیری کمی غلظت تیروکسین در سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این تست بر اساس الایزای رقابتی طراحی شده است. بی حرکت سازی کمپلکس ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در سطح چاهک و آنتی بادی بیوتینیل ه مونوکلونال ضد T4 صورت می گیرد. نمونه های سرم و کالیبراتورها که حاوی T4 غیر کوئزوگه هستند به همراه آنتی بادی بیوتینیل ه به چاهک ها اضافه می شوند و سپس، T4 کوئزوگه (متصل به آنزیم HRP) درون چاهک ها ریخته می شود. به این ترتیب، T4 کوئزوگه برای اتصال به جایگاه های محدود آنتی بادی (که در مرحله اول مصرف نشده اند) با T4 موجود در نمونه رقابت می کند. پس از شستشوی چاهک ها، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی تولید می شود که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. میزان رنگ ایجاد شده و در نتیجه شدت جذب نوری، با غلظت T4 موجود در نمونه ها و کالیبراتورها، نسبت عکس دارد. در نهایت غلظت T4 نمونه ها توسط منحنی استاندارد محاسبه می گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده: دو عدد.
- ۲) کالیبراتور (T4 Cal A - F): شش ویال در غلظت های ۰، ۲، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۵ µg/dL تهیه شده از سرم انسان.
- ۳) محلول کوئزوگه آنزیمی (T4 Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی لیتری حاوی T4 متصل به آنزیم HRP.
- ۴) محلول کوئزوگه بیوتینی (T4 Biotin Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی لیتری حاوی آنتی بادی متصل به بیوتین در بافر.
- ۵) محلول (Assay Buffer): یک ویال ۱۱ میلی لیتری.
- ۶) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی لیتری.
- ۷) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): دو ویال ۶/۵ میلی لیتری.
- ۸) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): دو ویال ۶/۵ میلی لیتری.
- ۹) محلول متوقف کننده واکنش (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری.
- ۱۰) محلول کنترل سطح یک (Control Level 1): یک ویال ۰/۵ میلی لیتری.
- ۱۱) محلول کنترل سطح دو (Control Level 2): یک ویال ۰/۵ میلی لیتری.
- ۱۲) برچسب مخصوص پلیت: دو ورق.

توجه ۱: کلیه محلول ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است. توجه ۲: مقادیر کنترل (ها) در COA درج شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

- ۱) دستگاه خوانش گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
- ۲) سمپلر کالیبره.
- ۳) 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 کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBsAg، HIV1/2 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 در نظر گرفتن 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. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری کنید.
- 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، آماده سازی و نگهداری نمونه:

- ۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم است. 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 سیهاگری 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) در افرادی که دوز بالای آ بیوتین (>5 mg/day) را دریافت می کنند، نمونه گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.
- ۳) درب ظرف نمونه ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه ها تا ۱ روز در دمای اتاق و 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 و نگهداری معرف ها:

- ۱) 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.

- ۲) آماده سازی محلول رنگزا: قبل از شروع استفاده از کیت، کل حجم محلول رنگزا B (ویال روشن) را داخل محلول رنگزا A (ویال تیره) خالی نمایید و برای انجام تست تا پایان مصرف کیت استفاده نمایید. 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 تمام اجزاء کیت و نمونه ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی گراد) رسیده اند. کالیبراتورها، کنترل ها و نمونه ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.
- ۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام تست 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، نمونه ها و یا کنترل 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 ۵۰ میکرولیتر از Assay Buffer در چاهک های مورد نظر بریزید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
- ۴) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول کوئزوگه بیوتینی به همه چاهک ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
- ۵) چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- ۶) حجم ۵۰ میکرولیتر از کوئزوگه آنزیمی به همه چاهک ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
- ۷) چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- ۸) محتویات پلیت را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید و چاهک ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت گیر بزنید. به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت اقدام کنید.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می باشد.

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می دهد که کیت مورد نظر در زمان های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

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 تلفن های مندرج بر روی جعبه بخش پشتیبانی تماس بگیرید.

توجه: چنانچه از دستگاه های الایزا پروسسور استفاده می کنید، می توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.

۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست، غلظت T4 در رقت های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 10\%$ است.

No.	Sample (µg/dL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	3.8	2.3	-2.9	-2.0	-2.2
2	9.4	-2.0	3.5	-1.4	-2.4
3	16.2	-1.9	-2.1	-3.4	-1.8

۵) بررسی ویژگی-آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)

ویژگی این آزمایش با اضافه کردن غلظت های مختلفی از مواد مندرج در جدول زیر به نمونه سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه گیری نسبت بین دوز ماده اضافه شده به دوز T4 مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب ارزیابی شد. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده $10 \pm 10\%$ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Analyte	Cross Reactivity	Concentration
L-Thyroxine	1	-
D-Thyroxine	0.9800	10 µg/dL
D-Triiodothyronine	0.0150	100 µg/dL
L-Triiodothyronine	0.0300	100 µg/dL
Iodothyrosine	0.0001	100 µg/ml
Diiodothyrosine	0.0001	100 µg/ml
Diiodothyronine	0.0001	100 µg/ml

۶) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با $0.51 \mu\text{g/dL}$ تعیین گردید.

$$\begin{aligned} \text{LOD} &= \text{LOB} + 1.645 \text{ SD}_s \\ \text{LOB} &= \text{Mean}_b + 1.645 \text{ SD}_b \\ (\text{s: Diluted sample \& b: Blank}) \end{aligned}$$

۷) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی گراد.

مقادیر مورد انتظار برای تست T4 به روش الایزا

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 تعیین گردد.

Normal Range for Adults
4.5 – 12.5 µg/dL

پارامترهای کنترل کیفی

۱) بررسی دقت-آزمون دقت درون دور (Within-Run)

دقت درون دور با ارزیابی تکرار پذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت های 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 T4 (µg/dL)	3.1	9.6	16.2
SD (µg/dL)	0.13	0.44	0.72
CV (%)	4.2	4.6	4.4

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

دقت بین دور با ارزیابی تجدید پذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت های 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 T4 (µg/dL)	4.0	6.8	19.2
SD (µg/dL)	0.20	0.35	0.87
CV (%)	5.0	5.1	4.5

۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و به عنوان یک نمونه غلظت T4 در آن اندازه گیری 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	13.2	2.94	8.07	7.99	99.0
2	6.5	13.2	9.85	9.9	100.5
3	2.94	6.4	4.67	4.77	102.1

۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده شده (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک ها 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، می توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۵ دقیقه افزایش دهید.

۱۰) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به کلیه چاهک ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

۱۱) مقدار جذب نوری را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از روش **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 ارائه شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (µg/dL)
Cal. A	A1	2.703	2.721	0
	B1	2.739		
Cal. B	C1	1.928	1.962	2
	D1	1.996		
Cal. C	E1	0.943	0.960	5
	F1	0.977		
Cal. D	G1	0.569	0.577	10
	H1	0.585		
Cal. E	A2	0.367	0.386	15
	B2	0.405		
Cal. F	C2	0.192	0.202	25
	D2	0.212		

