کیت سنجش هورمون تیروکسین (T4) به روش الایزا

مقدمه :

هورمون تیروکسین (T4) در غده تیروئید از ید و تیروزین ساخته می شود. فقط ۰/۰۲ تا ۰/۰۳ درصد از این هورمون در خون بصورت آزاد وجود دارد و بقیه این هورمون بصورت متصل با پروتئینها ست که اصلی ترین این پروتئینها ، تیروکسین بایندینگ گلوبولین (TBG) می باشد ، مقدار کل تیروکسین در خون (Total T4) به عنوان یک فاکتور مهم در بررسی وضعیت تیروئید مطرح می باشد. بطور معمول در سرم افراد مبتلا به هیپرتیروئیدیسم مقدار T4 افزایش یافته و در افراد دچار هیپوتیروئیدیسم مقدار آن کاهش می یابد ولی در هر حال در مواردی که مقدار پروتئینهای متصل شونده به تیروکسین به دلایل فیزیولوژیک، ژنتیک و یا فارماکولوژیک به صورت نرمال نمی باشد ممکن است که اندازه گیری مقدار کل T4 به تنهایی نتواند فاکتور صحیحی در سنجش عملکرد تیروئید باشد. کیت حاضر قابلیت اندازه گیری و تیتراسیون هورمون تیروکسین را با اختصاصیت و حساسیت بسیار بالا دارا می باشد .

اساس آزمایش :

کیت T4 حاضر به روش رقابتی وبه کمک آنتی بادی مونوکلونال طراحی گردیده است. در این روش چاهکها توسط آنتی بادی منوکلونال که بر علیه مولکول T4 می باشد پوشش داده می شوند (Coating) . استانداردها و نمونه بیماران با آنتی بادی پوشش داده شده در ته چاهکها مجاور شده و سپس محلول اسی بافر (Assay buffer) و در پی آن T4 کنژوگه با آنزیم HRP به چاهکها اضافه می شوند که این T4 کنژوگه (T4-HRP) با T4 موجود در نمونه در اتصال به آنتی بادیهای کوت شده در چاهکها رقابت می کند، بنابراین هر چه مقدار T4 در نمونه بیشتر باشد مقدار T4 کنژوگه کمتری به آنتی بادی های کوت شده متصل می گردد و بالعکس . پس از شستشو محلول رنگزا که محتوی هیدروژن پراکسید (H2O2) وکروموژن است به داخل چاهکها ریخته شده و انکوبه می گردد که بعد از انکوباسیون رنگ آبی پدید آمده به صورت معکوس با غلظت T4 موجود در نمونه ها متناسب است. برای جلوگیری از فعالیت بیش از اندازه و نامناسب آنزیم محلول متوقف کننده افزوده می گردد که فعالیت آنزیم را متوقف کرده و رنگ آبی را به زرد تبدیل می نماید که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد .

محتویات کیت :

۱) پلیت ۹۶ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد T4 (Anti-T4 Coated Plate) .
۲) محلول آنزیم کنژوگه (T4 Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۶ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۳) اسی بافر (Assay buffer) : یک ویال حاوی ۶ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۴) سری استانداردها (Standards Set) : ۶ ویال استاندارد شامل غلظتهای ۰، ۲ ، ۴ ، ۸ ، ۱۲ , ۲۰ µg/dl از T4 (استاندارد صفر حاوی ۱ میلی لیتر و سایر استانداردها حاوی ۰/۵ میلی لیتر می باشند) .
۵) سرم کنترل : یک ویال حاوی ۰/۵ میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال .
۶) محلول شستشو (Wash Solution) : یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۲۰ X) . جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف مقدار لازم از محلول شستشوی غلیظ را به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق کنید .
۷) محلول رنگزای یک مرحله ای(Chromogen-Substrate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۸) محلول متوقف کنندهٔ (Stop Solution) : یک ویال حاوی ۱۲میلی لیتر اسید کلریدریک ۱ نرمال .
۹) برچسب مخصوص پلیت .

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

۱) دستگاه الایزاریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) .
۲) سمپلر های ۲۵, ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر دقیق .
۳) آب مقطر .

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان:

۱) محتویات این کیت برای مصرف در همین کیت تعبیه شده است .
۲) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش چهارم – تیر ۱۳۹۳

۳) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg و آنتی بادی های ضد HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند، جهت احتیاط بهتر است هر پرسنلی که با کیت کار می کند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزد .

شرایط نگهداری :

۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید .
۲) چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید .
۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای یاد شده بر روی هر یک از آنها می باشد .
۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۸– ۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم یا پلاسما را می توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود ، نمونه را می توان به مدت دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و یا برای مدت زمان طولانی تر (ماکزیمم ۳۰ روز) در دمای ۲۰– درجه سانتی گراد نگهداری نمود (در ضمن باید از Freez-thaw نمودن نمونه پرهیز شود) .

توضیحات عمومی :

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق برسانید .
۲) بهتر است بمحض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند .
۳) از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید .
۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده جذب نوری چاهکها حد اکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .
۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند .
۶) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب زمان انکوباسیون مناسب می باشد، بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب محلولهای مورد نیاز را باز کنید، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیقتر می شود .
۷) به دلیل مشابه در بند ۶ بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه ها بیش از ۵ دقیقه بطول نیانجامد .

مراحل انجام آزمایش :

۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب نموده و باقی چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید.
۲) ۲۵ میکرولیتر از هر استاندارد، سرم کنترل و نمونه را به داخل هر چاهک بریزید . پیشنهاد می گردد که از استانداردها و نمونه ها بصورت داپلیکیت استفاده شود بدین معنی که هر استاندارد و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید ، سپس ۵۰ میکرولیتر اسی بافر (Assay buffer) و در پی آن ۵۰ میکرولیتر آنزیم کنژوگه را در داخل چاهک ها ریخته و برای مدت ۱۵ ثانیه پلیت را تکان دهید تا محتویات چاهکها خوب مخلوط شوند و آنگاه درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت ۱ ساعت در درجه حرارت اتاق (۲۸– ۲۲ درجه سانتی گراد) و در تاریکی انکوبه نمایید .
۳) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (برای شستشو می توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد، در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو چاهک ها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بزنید تا قطرات اضافی خارج شوند .
۴) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen - Substrate) به هر چاهک اضافه نمایید و چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید .
۵) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید . برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزاریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نمایید (توصیه میشود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد) .

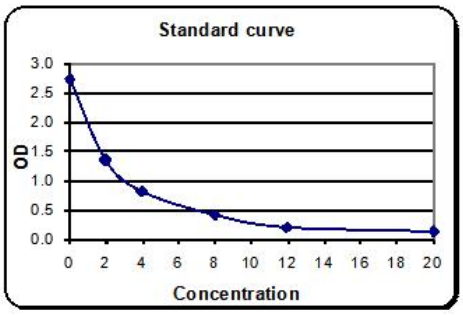
محاسبه نتایج :

از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm میتوان استفاده نمود .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش چهارم – تیر ۱۳۹۳

۱) جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید .
۲) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آنها نموداری (Point to point) رسم کنید به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آنها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد بدست آورید ، سپس نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی بدست آید .
۳) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن را پیدا کنید ، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید بطوریکه این خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و بعد از محل تلاقی خط و منحنی ، خطی عمود بر محور افقی وارد کنید نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد .

جذب نوری	استانداردها (µg/dl)
۲/۷۲	۰
۱/۳۵	۲
۰/۸۲	۴
۰/۴۱	۸
۰/۲۱	۱۲
۰/۱۲	۲۰



توجه : جذبهای نوری و منحنی مربوطه فقط به عنوان نمونه می باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

مقادیر مورد انتظار :

مقادیر نرمال T4 در سرم افراد طبیعی که توسط تستهای مکرر به روش الایزا بدست آمده به قرار زیر می باشد ولی پیشنهاد می گردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد :

میانگین محدوده طبیعی µg/dl	محدوده طبیعی µg/dl
۸/۶	۴/۷–۱۲/۵

«g/dl × 12.87 = nmol/L
nmol/L × 0.078 = «g/dl

شاخصهای اجرایی :

۱) حداقل مقدار قابل اندازه گیری :

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر ومنهای سه برابر انحراف معیار (SD) حد اقل غلظت T4 قابل تشخیص در این کیت µg/dl۰/۴ می باشد.

۲) دقت آزمایش :

آزمایشهای اینترا–اسی (همخوانی غلظت مشخص ازیک نمونه در یک سری آزمایش) و اینتر– اسی (همخوانی غلظت مشخص ازیک نمونه در سری آزمایش های مختلف) با استفاده از ۳ سرم با غلظتهای مختلفT4 انجام گردید که در جداول ۱ و ۲ آمده است :

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش چهارم – تیر ۱۳۹۳

جدول شماره۱ (اینترا- اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (µg/dl)	SD	CV%
۱	۲۴	۳/۶	۰/۱۸	۵
۲	۲۴	۹/۵	۰/۵۵	۵/۸
۳	۲۴	۱۶	۰/۵۸	۳/۶

جدول شماره ۲ (اینتر- اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (µg/dl)	SD	CV%
۱	۱۰	۳/۸	۰/۲۱	۵/۵
۲	۱۰	۹/۹	۰/۷۶	۷/۶
۳	۱۰	۱۵/۳	۰/۶۸	۴/۴

هر سری آزمایش بصورت Duplicate انجام شده است .

۳) ریکاوری آزمایش :

مقادیر معلومی از T4 به ۴ سرم با غلظتهای مشخص T4 افزوده شد و ریکاوری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول زیر آمده است :

نمونه	مقدار T4 موجود در سرم (µg/dl)	مقدار افزوده شده T4 (µg/dl)	مقدار مورد انتظار (µg/dl)	مقدار بدست آمده (µg/dl)	ریکاوری (%)
۱	۲/۵	۲	۲/۲۵	۲/۴	۱۰۷
۱	۲/۵	۸	۵/۲	۵/۱	۹۸
۱	۲/۵	۲۰	۱۱/۲	۱۲	۱۰۷
۲	۴	۲	۳	۲/۸	۹۳
۲	۴	۸	۶	۶/۳	۱۰۵
۲	۴	۲۰	۱۲	۱۲	۱۰۰
۳	۷	۲	۴/۵	۴/۲	۹۳
۳	۷	۸	۷/۵	۷/۱	۹۵
۳	۷	۲۰	۱۳/۵	۱۳/۹	۱۰۳
۴	۱۱	۲	۶/۵	۷/۱	۱۰۹
۴	۱۱	۸	۹/۵	۹	۹۵
۴	۱۱	۲۰	۱۵/۵	۱۶/۵	۱۰۶

۴) خطی بودن آزمایش :

با کمک استاندارد صفر ، رقتهای متوالی از ۴ نمونه سرم با غلظت مشخص از T4 تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت محاسبه شد که در جدول زیر نتایج آن آورده شده است .

نمونه	مقدار T4 موجود در سرم رقیق نشده (µg/dl)	ریکاوری (٪)			
		رقت ۱/۲	رقت ۱/۴	رقت ۱/۸	رقت ۱/۱۶
۱	۸/۵	۹۵	۱۰۶	۹۱	---
۲	۱۲	۹۴	۹۱	۱۰۹	---
۳	۲۱	۹۶	۹۰	۹۲	۹۱
۴	۲۸	۹۰	۹۴	۱۰۹	۱۰۷

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱٤۹٤۷۳٤٤٦۳
تلفن ٤۲۱۹۷۰۰۰ فکس ٤۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش چهارم – تیر ۱۳۹۳

0) اختصاصیت آزمایش :

اختصاصیت این آزمایش به کمک سرمهایی با غلظتهای مختلف (T3) 3, 3', 5 – Triiodothyronine – 3, 3', 5' Triiodothyronine (rT3) 3, 3', 5 - Triiodothyro acetic acid 3, 3', 5 Triiodothyropropionic acid و 3, 5 – Diiodothyronine جهت بررسی واکنشهای متقاطع با T4 بررسی شد که نتایج آن در جدول زیر آمده است :

جدول اختصاصیت (واکنش متقاطع) :

آنالیت	غلظت (nmol/L)	غلظت ظاهری T4 (µg/dl)
3, 5 - Diiodothyronine	۱۰۰۰	<۰/۴
3, 3', 5 – Triiodothyronine (T3)	۱۰۰	<۰/۴
3, 3', 5' - Triiodothyronine (rT3)	۱۰۰	<۰/۴
3, 3', 5 - Triiodothyro acetic acid	۱۰۰	<۰/۴
3, 3', 5 – Triiodothyropropionic acid	۱۰۰	<۰/۴

References:

Liewendahl K: Assessment of thyroid status by laboratory methods: development and perspectives. Scand J Clin Invest 50 (Suppl 201) : 83-92, 1990.
Cavalieri RR, Rapoport B: "Impaired peripheral conversion of Thyroxine to Triiodothyronine." Ann Rev Med 28:57-65,1977.
Spector DA et al: "Thyroid function and metabolic state in chronic renal failure." Ann Int Med 85:724-730,
Burr WA et al: "Serum triiodothyronine and reverse triiodothyronine concentrations after surgical operation." Lancet II:1277-1279,1975

روش انجام آزمایش T4بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی بادی جهت تست T4			
محلولها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
استانداردها	۲۵ میکرولیتر	–	–
سرم کنترل	–	۲۵ میکرولیتر	–
نمونه	–	–	۲۵ میکرولیتر
اسی بافر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر
آنزیم کنژوگه	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر
پلیت را به ملایمت برای مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهکها بخوبی مخلوط شوند و سپس دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید. ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید .			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر(و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس)قرائت کنید .			

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

ویرایش چهارم – تیر ۱۳۹۳