

MONOKIT

کیت اندازه‌گیری T-Uptake در سرم انسان

T-Uptake ELISA Kit
96 Tests / Cat. No: 1334-96
192 Tests / Cat. No: 2234-192
Rev: A1 (1402/09/25)

مقدمه:

غلظت هورمون‌های تیروئیدی آزاد موجود در خون ارتباط معکوسی با سطح پروتئین‌های حامل این هورمون‌ها دارد. سه نوع از پروتئین‌ها با ظرفیت و تمایل متفاوت برای اتصال به T3 و T4 شناخته شده‌اند. گلوبولین متصل شونده به تیروکسین (TBG)، ۶۵ تا ۷۵ درصد از هورمون‌های تیروئید را در خون حمل می‌کند. پره‌آلبومین متصل شونده به تیروکسین (TBPA) و آلبومین نیز به میزان کمتری به هورمون‌های تیروئیدی متصل می‌شوند. درصد بسیار کمی از تیروکسین به صورت آزاد در خون بدون پیوند باقی می‌ماند. در برخی شرایط پاتولوژیک، غلظت پروتئین‌های سرم افزایش می‌یابد که منجر به افزایش غلظت کل هورمون‌های تیروئید (به ویژه T4) می‌شود، در حالی که عملکرد تیروئید طبیعی است. تعیین میزان T-Uptake همراه با تعیین مقدار کل هورمون‌های تیروئید در شرایط خاص، شاخص بهتری برای ارزیابی عملکرد تیروئید است. حیطة کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی سطح T-Uptake در نمونه سرم انسان یا پلاسما به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این تست بر پایه الایزای رقابتی طراحی شده است. محلول کونژوگه آنزیمی حاوی T4 آزاد و T3 کونژوگه شده با آنزیم HRP می‌باشد. پروتئین‌های حامل هورمون‌های تیروئیدی در سرم (بر اساس ظرفیت اتصال هر پروتئین) به مقداری از T4 آزاد موجود در معرف آنزیمی متصل می‌شوند ولی قابلیت اتصال به T3 کونژوگه شده با آنزیم HRP را ندارند. بخشی از T4 آزاد که به پروتئین‌های حامل متصل نشده است، برای اتصال به آنتی‌بادی تثبیت شده در سطح چاهک، با T3 کونژوگه رقابت می‌کند. پس از تخلیه و شستشوی چاهک‌ها، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که بیشترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد. در نهایت، میزان T-Uptake سرم به کمک منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

کیت ۱۹۲ تستی	کیت ۹۶ تستی	محتویات کیت
دو عدد	یک عدد	میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی آنتی‌بادی تثبیت شده ضد تیروکسین.
یک سری ویال با غلظت‌های متفاوت	یک سری ویال با غلظت‌های متفاوت	کالیبراتورها (T-Uptake Cal A-D)، چهار ویال با غلظت‌های درج شده بر روی لیبل ویال آن‌ها.
یک ویال ۲/۵ میلی‌لیتری	یک ویال ۱/۵ میلی‌لیتری	کونژوگه آنزیمی (Enzyme Conjugate)
دو ویال ۱۱ میلی‌لیتری	یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری	محلول رقیق‌کننده کونژوگه (Conjugate Diluent)
یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری	یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری	محلول شستشو (Wash Solution-50X)
دو ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	محلول رنگزا A (Substrate Solution A)
دو ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	محلول رنگزا B (Substrate Solution B)
یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری	یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری	محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop Solution)
دو ورق	یک ورق	برچسب مخصوص پلیت

توجه: غلظت کالیبراتورها در هر سری تولید مطابق با مقادیر درج شده بر روی لیبل آن‌ها و گواهی آنالیز محصول (COA) می‌باشد. تمام محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند:

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

احتیاط در استفاده از کیت:

- محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری کنید.
- کلیه محلول‌ها تا زمان انقضای کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضای آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.
- توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- محتویات این کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HCV و HBsAg، HIV1/2 بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین با توجه به احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های 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 کنید.

۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه:

۱) نمونه مناسب برای این تست سرم یا پلاسما است. از هپارین یا EDTA برای نمونه‌های پلاسما استفاده ننماید. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیه‌هرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.

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

آماده‌سازی معرف‌ها:

۱) آماده‌سازی محلول کونژوگه آنزیمی: محلول کونژوگه آنزیمی را با محلول رقیق‌کننده کونژوگه، به‌نسبت ۱:۱۰ رقیق کنید. برای مثال ۲۰۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی را به ۲ میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده کونژوگه اضافه کنید. این محلول برای ۲۰ چاهک قابل استفاده است. محلول آماده شده در طی ۲۴ ساعت باید مورد استفاده قرار گیرد.

۲) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی 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.

۳) آماده‌سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی آنکوبه 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 تمام اجزاء کیت، کنترل‌ها و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت کنید

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید.

۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها و نمونه‌ها در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید.

۴) چاهک‌ها را با چسب مخصوص پلیت ببوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق آنکوبه 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 آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت اقدام نمایید.

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






توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان آنکوباسیون 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 به‌آرامی 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 مدت Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج رفرنس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

1- <http://www.samantajhiz.com/Support.aspx>

علائم استفاده شده در برچسب 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
OBL	Own brand Labeling
	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)	18.52	31.41	43.73
SD (%U)	0.99	1.51	1.71
CV (%)	5.3	4.8	3.9

۳) بررسی درستی-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 پیرسون 0.987 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)

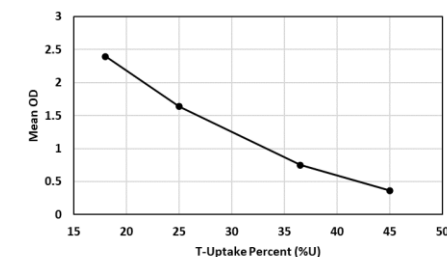
Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

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.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	T-Uptake (%U)
Cal. A	A1	2.376	2.395	18
	B1	2.414		
Cal. B	C1	1.628	1.637	25
	D1	1.647		
Cal. C	E1	0.733	0.748	36.5
	F1	0.763		
Cal. D	G1	0.353	0.362	45
	H1	0.371		



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)	22.95	29.29	46.61
SD (%U)	1.01	1.26	1.87
CV (%)	4.4	4.3	4.0