

MONOKIT

کیت اندازه گیری هورمون T4 در سرم انسان
T4 ELISA Kit
96 Tests: Cat. No: 0434-96
192 Tests: Cat. No: 1934-192
Rev: A4 (1402/09/25)

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 ۰/۳ درصد از T4 نیز به صورت آزاد در خون جریان دارد. T4 به عنوان پیش ساز و ذخیره هورمون فعال تیروئید (T3)، با دپدینه شدن در بافت ها به T3 تبدیل می شود که فعالیتی بسیار بیشتر از T4 دارد. اندازه گیری میزان T4 توتال به روش ایمنونواسی، تستی آسان و مطمئن جهت تشخیص نارسایی های تیروئید است. افزایش مقدار T4 در هیپرتیروئیدسم، بیماری های Graves و تیروئیدیت های حاد رخ می دهد. مقدار پایین T4 نیز در هیپوتیروئیدسم های مادرزادی، Myxedema، تیروئیدیت های مزمن (بیماری هاشیموتو) و یا دیگر نارسایی های ژنتیکی دیده می شود. حیطة 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. در این آزمایش T4 کونژوگه (متصل به آنزیم HRP) به همراه نمونه سرم یا کالیبراتور و یا کنترل که حاوی T4 طبیعی (غیر کونژوگه) است، به چاهک های حاوی آنتی بادی تثبیت شده اضافه می شوند. در زمان انکوباسیون، با رقابت میان دو آنتی ژن برای اتصال به آنتی بادی های ضد T4 در سطح چاهک، کمپلکس های ایمنی تشکیل می شوند. پس از شستشوی چاهک ها، با اضافه کردن 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. شدت رنگ ایجاد شده و در نتیجه میزان جذب، با غلظت T4 موجود در نمونه ها و کالیبراتورها نسبت عکس دارد. در نهایت غلظت T4 موجود توسط منحنی استاندارد محاسبه می گردد.

محتویات کیت:

کیت ۱۹۲ تستی	کیت ۹۶ تستی	محتویات کیت
دو عدد	یک عدد	میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی آنتی بادی تثبیت شده
یک سری	یک سری	کالیبراتورها (T4 CaL A-F): شش ویال با غلظت های ۰.۲، ۰.۵، ۱.۰، ۱.۵ و ۲.۵ µg/dL تهیه شده از سرم انسان
یک ویال ۳ میلی لیتری	یک ویال ۱/۵ میلی لیتری	محلول کونژوگه آنزیمی (T4 Enzyme Conjugate)
دو ویال ۱۲ میلی لیتری	یک ویال ۱۲ میلی لیتری	بافر رقیق کننده کونژوگه (Conjugate Diluent)
یک ویال ۲۰ میلی لیتری	یک ویال ۲۰ میلی لیتری	محلول شستشو (Wash Solution-50X)
دو ویال ۶/۵ میلی لیتری	یک ویال ۶/۵ میلی لیتری	محلول رنگزا A (Substrate Solution A)
دو ویال ۶/۵ میلی لیتری	یک ویال ۶/۵ میلی لیتری	محلول رنگزا B (Substrate Solution B)
یک ویال ۱۲ میلی لیتری	یک ویال ۱۲ میلی لیتری	محلول متوقف کننده واکنش (Stop Solution)
ویال (های) ۰/۵ میلی لیتری	ویال (های) ۰/۵ میلی لیتری	محلول کنترل (T4 Control)
دو ورق	یک ورق	برچسب مخصوص پلیت

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 برگه COA درج شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

- دستگاه خوانش گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
- سپمپر 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 کیت ها و یا شماره های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
- کلیه محلول ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول هایی که تاریخ انقضاء آن ها گذشته است استفاده نشود.
- توجه فرمایید محلول ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.

۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBS Ag، 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 شود.

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 جلوگیری نمایید.

۶) نمونه بیماران، محلول کنترل، چاهک ها و سر سپمپلرهای 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 کیت، سرم یا پلاسما (حاوی هپارین یا EDTA) 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 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 نشود.

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 یک ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه ها خودداری کنید.

آماده سازی و نگهداری معرف ها:

۱) آماده سازی محلول کونژوگه آنزیمی T4: محلول کونژوگه آنزیمی موجود در کیت را با محلول رقیق کننده کونژوگه به نسبت ۱:۱۰ رقیق کنید. به عنوان مثال، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از کونژوگه را به ۲ میلی لیتر محلول رقیق کننده اضافه کنید. این محلول برای ۲۰ چاهک قابل استفاده است. محلول کونژوگه رقیق 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 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 بکنواخت 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 نمایید.

۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل 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 همه چاهک ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه به آرامی روی سطح میز تکان دهید.

۴) چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک ها را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید. چاهک ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی 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 بریزید. به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت اقدام نمایید.

۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا آماده شده (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک ها بریزید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید. پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور، کمتر از ۲ به دست آمد، می توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش 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
OBL	Own brand Labeling
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

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

ویژگی این آزمایش با کمک اضافه کردن ترکیبات مندرج در جدول زیر به نمونه سرم، سنجش شد. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت غلظت ماده اضافه شده به غلظت 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-Thyroxin	1	-
D-Thyroxin	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

۷) 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 به‌صورت 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.

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.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean T4 (µg/dL)	3.63	7.20	14.24
SD (µg/dL)	0.19	0.35	0.67
CV (%)	5.2	4.8	4.7

۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین‌دور (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) 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)	2.80	9.73	16.91
SD (µg/dL)	0.16	0.51	0.87
CV (%)	5.7	5.2	5.1

۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و سطح T4 در ترکیب به‌دست آمده 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	3.40	8.22	5.81	5.97	102.7
2	8.63	16.51	12.57	12.82	102
3	14.34	3.80	9.07	8.96	98.7

۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (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	3.81	-0.8	-3.6	-3.2	-1.5
2	7.60	-2.8	-1.4	-1.0	-2.3
3	16.14	2.7	-3.6	3.9	-3.4

۵) 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 $0.15 \mu\text{g/dL}$ تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

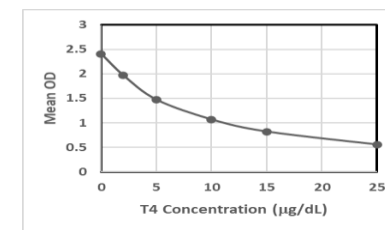
$$LOB = Mean_b + 1.645 SD_b$$

(s: DiLuted sample & b: BLank)

۷) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه 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 نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر، حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول‌موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه ارائه شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (µg/dL)
Cal. A	A1	2.397	2.410	0
	B1	2.423		
Cal. B	C1	1.945	1.972	2
	D1	1.999		
Cal. C	E1	1.460	1.473	5
	F1	1.486		
Cal. D	G1	1.058	1.068	10
	H1	1.078		
Cal. E	A2	0.806	0.820	15
	B2	0.834		
Cal. F	C2	0.546	0.554	25
	D2	0.562		



مقادیر مورد انتظار برای تست T4 به روش الیزا

شرکت تولیدکننده 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 درون‌دور (Within Run)

دقت درون‌دور 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.