SANABiO

کیت الایزا برای تعیین غلظت تام هورمون تیروکسین انسانی

Human Total Thyroxine (T4) ELISA Kit

کد محصول: SB-T4-102

۱. مقدمه

تیروکسین (T۴) و تری یدوتیرونین (T۳) از هورمون های تیروئیدی هستند که میزان ترشح آنها از طریق یک سیستم فیدبک حساس بین هیپوتالاموس و هیپوفیز تنظیم می گردد. این هورمون ها عمدتا به پروتئین های خاصی در سرم متصل می شوند، که بعنوان حامل این هورمون ها در جریان خون عمل می کنند. دو پروتئین اصلی عبارتند از Thyroxine Binding Globulin (TBG) و آلبومین. درصد بسیار کمی از این هورمون ها بصورت آزاد درجریان خون وجود دارند که این قسمت عامل فعالیت های بیولوژیکی این هورمون ها می باشد. مقدار تیروکسین کل (Total Thyroxin) به عنوان یک فاکتور مهم در بررسی وضعیت تیروئید مطرح است. بطور معمول در سرم افراد مبتلا به هیپرتیروئیدیسم مقدار T۴ افزایش داشته و در افراد دچار هیپوتیروئیدیسم مقدار آن کاهش می یابد.

۲. اصول اندازه گیری

کیت الایزای موجود بر اساس سنجش ایمونولوژیکی رقابتی تهیه شده است. در این کیت آنتی بادی منوکلونال ضد T۴ برروی پلیت پوشش داده شده است، و T۴ موجود در نمونه ها برای اتصال به این آنتی بادی با T۴ متصل به آنزیم Horseradish Peroxidase (HRP-T۴) رقابت می کند. پس از زمان انکوباسیون، پلیت ها تخلیه و شستشو می شوند .سپس سوبسترای آنزیم HRP که محلول TMB است اضافه شده و پس از گذشت زمان انکوباسیون، رنگ آبی ایجاد می شود. شدت رنگ بطور معکوس با غلظت T۴ در نمونه ها متناسب است. استانداردهای T۴ با غلظت مشخص، همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که بر اساس منحنی استاندارد جذب نور در مقابل غلظت T۴ ، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید. زمان کلی انجام پروسه سنجش حدود یکساعت و سی دقیقه می باشد

۳. معرف ها:

۳-۱- مواد موجود در کیت:

۱- کالیبراتورها (استانداردهای T۴) - ۱ ml/vial -[۱-۶]

۶ ویال یک میلی لیتری از استاندارد با غلظت های ۰، ۲، ۴، ۸، ۱۲ و ۲۰ میکروگرم در دسی لیتر (μg/dl) که در سرم نرمال انسانی تهیه شده است.

۲- سرم کنترل- ۱ ml/vial

یک ویال کنترل غلظت T۴ که باید در محدوده ذکر شده در برگه کنترل کیفی کیت باشد.

۳- کونژوگه آنزیمی (HRP -T۴) - ۱۲ ml/vial

این ویال آماده مصرف می باشد.

۴- پلیت های پوشش داده شده- ۹۶ چاهک جداشدنی

یک پلیت ۹۶ چاهکی که با آنتی بادی علیه T۴ پوشش داده شده است.

۵- محلول شستشو دهنده غلیظ (۲۰X) - ۲۵ ml/vial

طبق روش ذکر شده در بخش ۶ مصرف می شود.

۶- محلول- TMB ۱۲ ml/vial

یک ویال حاوی تترامتیل بنزوئیدین (TMB) در بافر و آماده مصرف

۷- محلول متوقف کننده واکنش- ۱۲ml/vial

یک ویال حاوی اسید قوی (اسیدسولفوریک یک نرمال)

۸- چسب پلیت

۹- بروشور کیت

۳-۲- مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

سمپلر ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری، آب دیونیزه، کاغذ جاذب رطوبت، ظرف شیشه ای جهت آماده سازی بافر ها ، تایمر، دستگاه الایزا ریدر

۴. موارد احتیاط

۱. از استفاده معرف های کیت پس از تاریخ انقضاء خودداری کنید و از مخلوط کردن یا استفاده از کیت ها با شماره بچ مختلف پرهیز نمائید.

۲. درب ظروف را پس از استفاده ببندید و از تعویض درب ها جدا خودداری کنید.

۳. کیت های باز نشده پس از تحویل باید در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد (یخچال) نگه داری شوند. میکروپلیت باید در کیسه در بسته به همراه ماده جاذب رطوبت نگه داری شود. کیت باید تا تاریخ انقضاء استفاده شود. برای اطلاع از تاریخ انقضاء به برچسب کیت مراجعه شود.

۴. فرآیند شستشو خیلی مهم است. شستشوی ناکافی باعث کاهش دقت و افزایش کاذب جذب می شود.

۵. از تماس محلول متوقف کننده واکنش ($1N\ H_2SO_4$) با پوست خودداری کنید. در صورت تماس، با آب فراوان آنرا بشوئید.

۶. در این کیت از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر HbsAg و HIV منفی بوده اند.

۵. تهیه و جمع آوری نمونه

آزمایش را باید بر روی نمونه های سرمی انجام داد. نمونه های شدیدا همولیزه و دارای چربی باید حذف شوند. نمونه ها را می توان برای دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد و برای زمان های طولانی تر (تا سی روز) در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمود. از انجماد و ذوب مکرر نمونه ها باید خودداری کرد.

۶. آماده سازی معرف ها

۱. قبل از استفاده کلیه معرف های کیت را سر و ته (invert) نمایید.

۲. برای تهیه محلول شستشو، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (۲۰X) را با ۱۹ حجم آب دیونیزه رقیق نمائید.

۷. روش انجام آزمایش

با توجه به حساسیت بالای تست توصیه می شود حداقل یکساعت قبل از شروع آزمایش، کیت را در دمای اتاق (۲۲-۲۷ درجه سانتیگراد) قرار دهید.

توصیه می شود این آزمایش توسط افراد مجرب و آموزش دیده انجام شود. زمانی که پروسه شروع می شود تمام مراحل باید بدون وقفه تا انتها پیش رود.

۱. تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار را مشخص کنید. استریپ های اضافی را در کیسه های زیپ دار قرار داده و در دمای ۲-۸ درجه و دور از نور نگهداری کنید.

۲. ۰/۰۲۵ میلی لیتر (25μl) از استانداردها، سرم کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر چاهک بریزید.

۳. ۰/۱ میلی لیتر (۱۰۰μl) از کونژوگه آنزیمی (HRP-T۴) را به تمام چاهک ها اضافه کنید.

۴. ۴- پلیت را بمدت ۶۰ - ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها خوب مخلوط شوند. سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهک ها را بمدت یک ساعت در درجه حرارت دمای اتاق (۲۸ - ۲۲ درجه سانتیگراد) و تاریکی انکوبه کنید.

۵. برچسب را با دقت از پلیت جدا کرده و محتویات چاهک ها را خالی یا آسپیره (Aspiration) نمایید.

۶. ۳۰۰ میکرولیتر از بافر شستشو آماده مصرف به هر چاهک اضافه و همراه با ضربه زدن به پلیت خالی نمایید. این مرحله ۴ بار تکرار شود (در مجموع ۵ بار). در پایان چاهک ها بر روی پارچه جاذب کاملا آبگیری شود. برای انجام این مرحله از دستگاه الایزا واشر اتوماتیک نیز می توان مطابق پروتکل مربوطه استفاده نمود.

۷. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول TMB به تمامی چاهک ها اضافه کنید. (استفاده از سمپلر چند کاناله دقت کار را بیشتر می نماید) و آنها را بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

۸. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همه چاهک ها اضافه کنید و بمدت ۲۰ ثانیه ضربه ملایم بزنید . خیلی مهم است تا مطمئن شوید رنگ آبی کاملاً به رنگ زرد تغییر پیدا کرده است.

۹. جذب نور هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید. قرائت جذب نوری باید حداکثر تا ۳۰ دقیقه پس از اتمام آزمایش انجام شود.

۸. محاسبه نتایج

۱. جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس nm ۶۳۰) بخوانید.

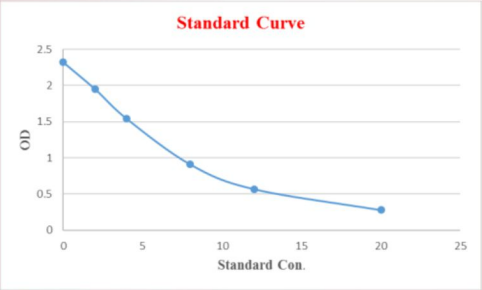
۲. با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آنها نمودار (Point to Point) رسم کنید به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (محور Y) و غلظت آنها را روی محور افقی (محور X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد بدست آورید ، سپس نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل 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 از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

۴. نمونه ای از نتایج و شکل منحنی استاندارد در زیر نشان داده شده است.

نکته: مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل تنها بعنوان راهنمایی آورده شده است و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید بدست آورد.

ردیف	مقدار استاندارد (µg/dl)	جذب
۱	۰	۲,۳۲
۲	۲	۱,۹۵
۳	۴	۱.۵۴
۴	۸	۰,۹۱
۵	۱۲	۰,۵۷
۶	۲۰	۰,۲۸



۹. مقادیر مورد انتظار:

مقادیر طبیعی در سرم افراد نرمال که توسط آزمایشات مکرر به روش الایزا بدست آمده است به قرار زیر می باشد ولی بدلیل اختلافات سنی، نژادی و رژیم تغذیه، نمی توان برای تمام جمعیت ها محدوده مرجع تعیین کرد و هر آزمایشگاه باید محدوده مرجع خود را گزارش نماید.

محدوده طبیعی **۱۲,۶ µg/dl –**

۴,۵

ng/ml× ۰,۱ = µg/dl

۱۰. شاخص های اجرایی

۱- دقت آزمایش

آزمایشهای اینتراسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و اینتر اسی(همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایشات مختلف) با استفاده از ۳ سرم با غلظتهای مختلف ۲۰ بار تکرار شد که ضریب تغییرات به شرح ذیل است:

اینترا اسی

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (µg/dl)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
۱	۲۰	۵,۵	۰,۴۳	۷,۹
۲	۲۰	۹,۵	۰,۵۴	۵,۷
۳	۲۰	۱۴,۸	۰,۶۲	۴,۲

اینتراسی

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (µg/dl)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
۱	۱۰	۴,۷	۰,۳۹	۸,۲
۲	۱۰	۸,۵	۰,۴۱	۴,۸
۳	۱۰	۱۶,۲	۰,۶۲	۳.۸

۲- حساسیت آزمایش

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و منهای سه برابر انحراف معیار، حساسیت این کیت برای تعیین مقدار هورمون T۴ برابر µg/dl ۱ بدست آمد.

۳- اختصاصیت آزمایش

از مواد زیر برای بررسی میزان تداخل این کیت استفاده شد.

نوع ماده	غلظت (µg/dl)	درصد تداخل
لووتیروکسین		۱۰۰
لیوتیرونین	۱	۰/۵۳
تری یدوتیرونین	۱۵	۰/۳۳
سدیم سالی سیلات	۱۰۰	۰/۲۹

۴- خطی بودن

سه نمونه مختلف سرمی با استاندارد صفر به نسبت های متوالی رقیق شدند. سپس غلظت T۴ در آنها با استفاده از کیت محاسبه شد که نتایج ذیل بدست آمد.

نمونه سرمی	غلظت اولیه	درصد ریکاوری		
		۱:۲	۱:۴	۱:۸
۱	۱۵۵/۴	۱۰۵	۹۶/۹	۹۷/۵
۲	۱۴۷/۶	۱۰۳	۹۸/۶	۹۴/۲
۳	۱۶۰/۵	۹۷/۵	۹۶/۵	۹۸/۶

References:

1. Agharanya JC. Clinical usefulness of ELISA technique in the assessment of thyroid function. West Afr J Med 1990;9(4):258-63.
2. American College of Physicians. Screening for thyroid disease. Ann Intern Med 1998; 129: 141-3.
3. Helfand M, Redfern CC. Screening for thyroid disease: an update. Ann Intern Med 1998; 129:144-58.
4. Karir T, Samuel G, Sivaprasad N, Meera V. Development of coated tubes RIA for serum T3 for production scale. J. Immunoassay & Immunochemistry 2005, 26, 77-87.