کیت سنجش T-Uptake به روش الایزا

حیطه کاربرد:

محصول T-Uptake ELISA Kit پیشتاز طب برای اندازه‌گیری ظرفیت پروتئین‌های حامل هورمون‌های تیروئیدی در سرم انسان طراحی شده است. این کیت تنها برای استفاده آزمایشگاهی می‌باشد و به عنوان ابزار کمکی در بررسی و ارزیابی عملکرد تیروئید کاربرد دارد.

مقدمه:

غده تیروئید تحت تنظیم هورمون تیروتروپین، هورمون‌های T3 و T4 را ترشح می‌کند. این هورمون‌ها به مقدار ناچیز به‌صورت آزاد در گردش خون وجود دارند و بخش عمده‌ی آن‌ها به‌صورت متصل به پروتئین‌های حامل یافت می‌شوند. سه پروتئین با تمایل و ظرفیت‌های متفاوت برای T3 و T4 شناخته شده‌اند که عبارتند از TBG که ۶۵ تا ۷۵ درصد از ظرفیت حمل هورمون‌های تیروئیدی را به عهده دارد، TBPA (Thyroxine binding pre-albumin) که ۱۵ تا ۲۰ درصد از ظرفیت حمل هورمون‌های تیروئیدی را به عهده دارد، و آلبومین که کمترین تمایل به هورمون‌های تیروئیدی را دارد ولی ظرفیت بالایی داشته و ۱۰ درصد از هورمون تیروکسین و ۳۰ درصد از هورمون T3 در دسترس را حمل می‌کند. از آن‌جا که فرایند متابولیسم به‌طور کامل توسط فرم آزاد هورمون‌های تیروئیدی تنظیم می‌گردد و این مقدار هورمون‌های آزاد وابستگی کاملی با میزان ظرفیت پروتئین‌های حامل آن‌ها دارد، اندازه‌گیری میزان این پروتئین‌ها اهمیت می‌یابد. تاکنون به منظور اندازه‌گیری ظرفیت پروتئین‌های حامل هورمون‌های تیروئیدی از روش‌های متعددی شامل Silicates، Ion-exchange و Denatured albumin استفاده شده است. یکی از جدیدترین و ساده‌ترین روش‌ها، روش EIA (Enzyme Immunoassay) است که از حساسیت بالایی برخوردار می‌باشد.

اساس آزمایش:

اساس این آزمایش بر روش سنجش رقابتی استوار است. به این ترتیب که چاهک‌های پلیت با آنتی‌بادی ضد T4 پوشانده شده‌اند و در هنگام انجام آزمایش، هورمون T4 به همراه T4 کونژوگه شده با آنزیم HRP و سرم به چاهک‌ها اضافه می‌شوند. در این هنگام پروتئین‌های حامل هورمون‌های تیروئیدی بر حسب ظرفیت خود مقداری از هورمون T4 را جذب می‌نمایند، ولی نمی‌توانند با هورمون T4 کونژوگه واکنشی نشان دهند. در نتیجه، مقداری از T4 که جذب پروتئین‌های حامل نگردیده است، بر سر اتصال به آنتی‌بادی‌های کف چاهک با هورمون T4 کونژوگه رقابت می‌نماید. بنابراین هر چه ظرفیت حمل پروتئین‌های سرم بالاتر باشد، مقدار T4 کمتری برای رقابت با T4 کونژوگه باقی مانده و در رقابت با آن در اتصال به آنتی‌بادی‌های کف چاهک‌ها ناموفق‌تر خواهد بود (و بالعکس). پس از شستشو، محلول سوبسترا به چاهک‌ها اضافه می‌گردد. هر چه میزان رنگ‌زایی بیشتر باشد، بیان‌گر بالاتر بودن میزان اتصال هورمون T4 کونژوگه است. این موضوع به این معنی است که مقدار T4 برداشت شده توسط پروتئین‌های حامل بالا بوده و بنابراین مقدار کمتری T4 برای رقابت باقی مانده است (و بالعکس). برای جلوگیری از فعالیت بیش از اندازه و نامناسب آنزیم، محلول متوقف کننده افزوده می‌گردد که فعالیت آنزیم را مختل کرده و رنگ آبی را به زرد تبدیل می‌نماید که بهترین جذب نوری را در طول موج 450 nm دارد.

محتویات کیت:

۱) پلیت ۹۶ خانه حاوی چاهک‌های پوشش داده شده با آنتی بادی ضد T4 (Anti-T4 Coated Plate).
۲) محلول آنزیم کونژوگه (Enzyme Conjugate): ویال حاوی محلول T4کونژوگه شده با آنزیم HRP (آماده مصرف).
۳) سری استاندارد (Standard Set): ۴ ویال استاندارد شامل غلظت‌های تقریبی ۱۵، ۲۶/۵ ، ۳۵/۵ و ۴۶ درصد. غلظت دقیق هر استاندارد بر روی ویال استانداردها درج گردیده است.
۴) محلول اسی بافر (Assay Buffer): ویال حاوی محلول بافری آماده مصرف.
۵) سرم کنترل (Control Serum): ویال حاوی سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی بر چسب ویال.
۶) محلول شستشو (Wash Solution): ویال حاوی محلول شستشوی غلیظ (20X). به‌منظور 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 مرحله‌ای (Chromogen-Substrate): ویال حاوی تترامتیل‌بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده مصرف).
۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution): ویال حاوی اسید کلریدریک ۱ نرمال.
۹) برچسب مخصوص پلیت.
۱۰) دفترچه راهنمای محصول.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند:

۱) دستگاه الایزا ریدر (ELISA Reader) دارای فیلتر 450 nm (و در صورت امکان 630 nm به عنوان فیلتر رفرانس).
۲) سمپلر های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر دقیق.
۳) آب مقطر.

نکات قابل ذکر برای مصرف‌کنندگان:

۱) محتویات این کیت فقط برای مصرف در همین کیت می‌باشد.
۲) از مخلوط کردن محتویات کیت‌ها با شماره ساخت‌های مختلف جداً خوداری نمایید.
۳) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBs Ag و آنتی‌بادی‌های ضد HCV و HIV کنترل گردیده‌اند و فاقد این عوامل می‌باشند. برای احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می‌کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند.
۴) نمونه بیماران، استانداردها، کنترل‌ها وچاهک‌های استفاده شده، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند. تمامی محلول‌های واکنش‌گر و معرف‌ها باید مطابق با مقررات ملی دفع پسماندهای عفونی امحا شوند.

آدرس: تهران، شهرک گلستان، بلوار گل‌ها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن: ۴۲۱۹۷۰۰۰، پیامک: ۳۰۰۰۷۱۴۰۲
info@pishtazteb.com, www.pishtazteb.com
ویرایش هفتم – شهریور ۱۴۰۴

شرایط نگهداری:

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

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه:

سرم یا پلاسما را می‌توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود. نمونه می‌تواند برای مدت دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و یا برای مدت طولانی‌تر (حداکثر تا ۳۰ روز) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شود. در ضمن باید از ذوب و انجماد مکرر نمونه پرهیز شود. از نمونه‌های مشکوک به آلودگی میکروبی برای انجام آزمایش استفاده نشود.

توضیحات عمومی:

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه‌ها را به دمای اتاق برسانید.
۲) بهتر است به محض 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 متوقف‌کننده، جذب نوری چاهک‌ها حداکثر تا نیم ساعت قابل اندازه‌گیری می‌باشد.
۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهک‌ها به صورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهک‌ها تخلیه شوند.
۶) در هنگام سمپلینگ، تمام محلول‌ها و نمونه‌ها را در وسط چاهک‌ها بریزید.
۷) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب، زمان انکوباسیون مناسب می‌باشد. بنابراین پیشنهاد می‌گردد 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 می‌شود.
۸) به دلیل مشابه در بند ۷ بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه‌ها بیش از ۵ دقیقه به طول نیانجامد.

مراحل انجام آزمایش:

۱) تعداد چاهک‌های مورد نظر را انتخاب نموده و سایر 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 می‌گردد استانداردها و نمونه‌ها به صورت دوپلیکیت (Duplicate) استفاده شوند؛ به این معنی که هر استاندارد و نمونه در دو چاهک قرار گیرد و در نهایت از میانگین جذب نوری آن‌ها برای محاسبه نتایج استفاده شود. سپس، ۵۰ میکرولیتر از محلول اسی بافر (Assay Buffer) را به هر چاهک اضافه کنید.
۳) ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه را به هر چاهک اضافه نمایید (بلافاصله بعد از اسی بافر).
۴) پلیت را برای مدت ۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک‌ها خوب مخلوط شوند و سپس درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهک‌ها را به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق (۲۸- ۲۲ درجه سانتی‌گراد) انکوبه نمایید.
۵) چاهک‌ها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (برای شستشو می‌توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود، ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود، زیرا می‌تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد. در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک‌ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید. در انتهای عملیات شستشو، چاهک‌ها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نم‌گیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند).
۶) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگ‌زا (Chromogen-Substrate) به هر چاهک اضافه نمایید. چاهک‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید.
۷) 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 الایزا ریدر با فیلتر 450 nm استفاده نمایید (توصیه می‌شود از فیلتر 630 nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد).

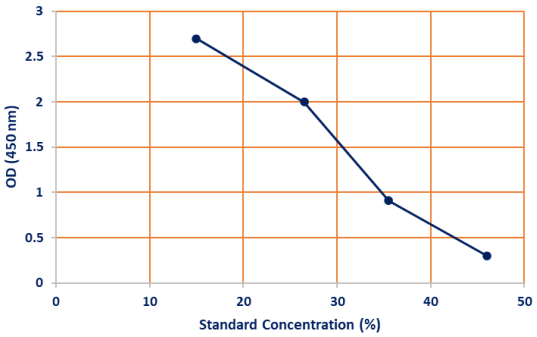
محاسبه نتایج:

از هر دستگاه الایزا ریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج 450 nm می‌توان استفاده نمود.

۱) جذب نوری استانداردها و نمونه‌ها را به کمک دستگاه الایزا ریدر در طول موج 450 nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس 630 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، به طوری که 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. (برای این کار می‌توانید از **محاسبه‌گر خودکار پیشتاز طب** استفاده کنید.)

آدرس: تهران، شهرک گلستان، بلوار گل‌ها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن: ۴۲۱۹۷۰۰۰، پیامک: ۳۰۰۰۷۱۴۰۲
info@pishtazteb.com, www.pishtazteb.com
ویرایش هفتم – شهریور ۱۴۰۴

جذب نوری	استانداردها (٪)
۲/۷۰	۱۵
۲/۰	۲۶/۵
۰/۹۱	۳۵/۵
۰/۳۰	۴۶



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

مقادیر مورد انتظار:

مقادیر نرمال در سرم افراد سالم که به توسط تست‌های مکرر به روش الایزا بدست آمده به قرار زیر می‌باشد ولی پیشنهاد می‌گردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد:

محدوده طبیعی (٪)	میانگین محدوده طبیعی (٪)
۲۵ – ۳۵	۳۰

محدودیت‌های کیت:

با وجود استفاده از مواد بلاک‌کننده آنتی‌بادی‌های هتروفیل در محلول‌های کیت، به علت وجود آنتی‌بادی‌های هتروفیل با منشاءهای متفاوت، امکان وجود نتایج کاذب وجود دارد. تفسیر تست‌های عملکرد تیروییدی با نتایج یک تست امکان پذیر نبوده و نتایج این آزمایش باید با نتایج سایر تست‌های تیروییدی به طور همزمان تفسیر شود. در هنگام تفسیر نتایج آزمایش‌های انجام شده با این کیت باید به تداخلات مختلف فیزیولوژیکی مثل مصرف داروهای خاص و سابقه بیماری توجه شود.

شاخص‌های اجرایی:

۱) دقت آزمایش:

آزمایش‌های Intra Assay (هم‌خوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و Inter Assay (هم‌خوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایش‌های مختلف) با استفاده از ۳ سرم با غلظت‌های مختلف T-Uptake انجام گردید که در جداول ۱ و ۲ آمده است. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP05-A3 انجام شده است.

جدول ۱- نتایج Intra Assay.

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (٪)	SD	CV%
۱	۲۴	۲۲	۰/۵۹	۲/۷
۲	۲۴	۳۵/۴	۰/۸۴	۲/۴
۳	۲۴	۴۵/۳	۰/۷۰	۱/۵

جدول ۲ – نتایج Inter Assay.

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (٪)	SD	CV%
۱	۱۰	۱۷/۲	۰/۶۰	۳/۵
۲	۱۰	۲۷/۲	۱/۰۷	۳/۹
۳	۱۰	۳۶	۱/۰۵	۲/۹

* هر سری آزمایش به صورت داپلیکیت انجام شده است.

آدرس: تهران، شهرک گلستان، بلوار گل‌ها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن: ۴۲۱۹۷۰۰۰، پیامک: ۳۰۰۰۷۱۴۰۲
info@pishtazteb.com, www.pishtazteb.com
ویرایش هفتم – شهریور ۱۴۰۴

منابع:

- Inada, M., and Sterling, K., Clin. Invest(1967),46,1442.
- Murphy,B.,1968, Radioisotopes in Medicine, U.S. Atomic Energy Commission, Technical Information Center, Tennessee. (https://www.gutenberg.org/files/49377/49377-h/49377-h.htm)
- Hollander, C.S. and Shenkman, L., 1974, Methods of Hormone Radioimmunnassay, Academic Press,New York. (https://doi.org/10.1016/0022-1759(72)90003-8)
- Hamolsky, M.W., Stein, M. and Freedberg, S.A., The Thyroid Hormone-Plasma Protein Complex In Man. Ii. A New In Vitro Method For Study Of “Uptake” Of Labelled Hormonal Components By Human Erythrocytes, J.Clin. Endocrionol.(1957),17,33. (https://doi.org/10.1210/jcem-17-1-33)
- Hebert, V., U. S. Patent Office #3(1971), 422, 819.
- Mitchell, M. L., Harden, A. B. and O Rouke, M. E., Differences in the response of euthyroid and hyperthyroid patients to thyroinhibitory substances, J. Clin. Endocrionol., (1960) 20, 1474. (https://doi.org/10.1210/jcem-21-12-1566)
- Rolleri, E., Buzzigoli, G., and Plassio, C., J. Nucl. Med. (1972)., 13, 892.
- Nusynowitz, M. L., and Ealiszewski, Am. J. Clin. Pathol. (1971)., 56. 523.
- Clark, F. and Horn, D. B., J. Clin. Endocrionol (1965). Metab., 25, 93. (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14252286/)
- Young. D. S., Pestaner, L. C. and Gilberman, U., Clinical Chemistry (1975), 21, 3660. (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1091375/)

جدول علائم:

	Use by	**تاریخ انقضاء**
	Batch code	**شماره سری ساخت**
	Serial number	**شماره سریال**
	Date of manufacture	**تاریخ تولید**
	Catalogue number	**شماره کاتالوگ**
	Caution: consult accompanying documents	**توجه به مدارک همراه**
	Manufacturer	**تولیدکننده**
	Contains sufficient for <n> tests	**محتویات برای n تست کافیست**
	In vitro diagnostic medical devices	**فرآورده تشخیصی**
	Temperature limitation	**محدوده دمای نگهداری**
	Consult instructions for use	**کتابچه راهنما**
	Biological risks	**خطرات زیستی**
	Control	**کنترل**
	Negative control	**کنترل منفی**
	Positive control	**کنترل مثبت**

آدرس: تهران، شهرک گلستان، بلوار گل‌ها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن: ۴۲۱۹۷۰۰۰، پیامک: ۳۰۰۰۷۱۴۰۲
info@pishtazteb.com, www.pishtazteb.com
ویرایش هفتم – شهریور ۱۴۰۴

روش انجام آزمایش T-Uptake (TUP) به صورت شماتیک

چاهک‌های کوت شده با آنتی‌بادی به منظور تست T-Uptake			
محلول‌ها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
استانداردها	۲۵ میکرولیتر	–	–
سرم کنترل	–	۲۵ میکرولیتر	–
نمونه	–	–	۲۵ میکرولیتر
اسی بافر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر
آنزیم کونژوگه	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر
پلیت را به ملایمت برای مدت **۱۵ ثانیه** تکان دهید تا محتویات چاهک‌ها بخوبی مخلوط شوند. سپس دهانه چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید. **۶۰ دقیقه** در **دمای اتاق** 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 میکر×۱ولیتر
۱۵ دقیقه در **دمای اتاق** و در **تاریکی** انکوبه کنید.			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهک‌ها را با طول موج **450 nm** (و در صورت امکان 630 nm به عنوان فیلتر رفرانس) خوانش کنید.			

جدول محتویات کیت

محتویات کیت	فرمت ۴۸ تستی	فرمت ۹۶ تستی	فرمت ۱۹۲ تستی
پلیت Plate	1×48-wells	1×96-wells	2×96-wells
محلول آنزیم کونژوگه Enzyme Conjugate	1×3 ml	1×6 ml	1×12 ml
سری استانداردها Standard Set	St.: 4×0.5 ml	St.: 4×0.5 ml	St.: 4×1 ml
سرم کنترل Control Serum	1×0.5 ml	1×0.5 ml	1×1 ml
محول اسی بافر Assay Buffer	1×3 ml	1×6 ml	1×12 ml
محلول رنگ‌زای یک مرحله‌ای Chromogen - Substrate	1×6 ml	1×12 ml	2×12 ml
محلول شستشو Wash Solution	1×25 ml	1×50 ml	2×50 ml
محلول متوقف‌کننده Stop Solution	1×6 ml	1×12 ml	2×12 ml
برچسب مخصوص پلیت Cardboard Sealer	1	1	2
دستورالعمل استفاده Instruction for Use	1	1	1

آدرس: تهران، شهرک گلستان، بلوار گل‌ها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن: ۴۲۱۹۷۰۰۰، پیامک: ۳۰۰۰۷۱۴۰۲
info@pishtazteb.com, www.pishtazteb.com
ویرایش هفتم – شهریور ۱۴۰۴