

کیت سنجش هورمون تیروکسین (T4) به روش الایزا

حیطه‌ی کاربرد:

کیت الایزای T4 پیشتاز طب برای اندازه‌گیری کمی هورمون تیروکسین در سرم انسان طراحی شده است. این کیت به عنوان یک ابزار کمک تشخیصی در بررسی و ارزیابی اختلالات عملکرد تیروئید، شامل کم‌کاری و پرکاری تیروئید، به کار می‌رود. نتایج این کیت باید همراه با یافته‌های بالینی و سایر روش‌های تشخیصی تفسیر شود. محتوای این کیت تنها برای استفاده آزمایشگاهی است.

مقدمه:

هورمون تیروکسین (T4) در غده تیروئید از ید و تیروزین ساخته می‌شود. فقط ۰/۰۲ تا ۰/۰۳ درصد از این هورمون در خون به صورت آزاد وجود دارد و بقیه این هورمون به صورت متصل یا پروتئین‌هاست که اصلی‌ترین این پروتئین‌ها، تیروکسین بایندینگ گلوبولین (TBG) می‌باشد. مقدار کل تیروکسین در خون (Total T4) به عنوان یک فاکتور مهم در بررسی وضعیت تیروئید مطرح می‌باشد. به طور معمول در سرم افراد مبتلا به هیپرتیروئیدیسم مقدار T4 افزایش و در افراد دچار هیپوتیروئیدیسم مقدار این هورمون کاهش پیدا می‌کند. با این حال، اگر مقدار پروتئین‌های متصل‌شونده به تیروکسین به دلایل فیزیولوژیک، ژنتیک یا فارماکولوژیک نرمال نباشد، اندازه‌گیری مقدار کل T4 به‌تنهایی نمی‌تواند شاخص دقیقی برای سنجش عملکرد تیروئید باشد. کیت حاضر قابلیت اندازه‌گیری و تیتراسیون هورمون تیروکسین را با اختصاصیت و حساسیت بسیار بالا دارا می‌باشد.

اساس آزمایش:

کیت الایزای T4 به روش الایزای رقابتی و به کمک آنتی‌بادی مونوکلونال طراحی گردیده است. در این روش چاهک‌ها توسط آنتی‌بادی مونوکلونال که بر علیه مولکول T4 می‌باشد پوشش (Coating) داده می‌شوند. استانداردها و نمونه بیماران با آنتی‌بادی پوشش داده شده در ته چاهک‌ها مجاور شده و سپس محلول اسی بافر (Assay Buffer) و در پی آن T4 کوئزوگه با آنزیم HRP به چاهک‌ها اضافه می‌شوند. این T4 کوئزوگه (T4-HRP) با T4 موجود در نمونه در اتصال به آنتی‌بادی‌های کوت شده در چاهک‌ها رقابت می‌کند. بنابراین هر چه مقدار T4 در نمونه بیشتر باشد مقدار T4 کوئزوگه کمتری به آنتی‌بادی‌های کوت شده متصل می‌گردد و بالعکس. پس از شستشو، محلول رنگ‌زا که محتوی هیدروژن پراکسید (H₂O₂) و کروموزن است به داخل چاهک‌ها ریخته شده و انکوبه می‌گردد. پس از انکوباسیون رنگ آبی پدید آمده به صورت معکوس با غلظت T4 موجود در نمونه‌ها متناسب است. برای جلوگیری از فعالیت بیش از اندازه و نامناسب آنزیم، محلول متوقف کننده افزوده می‌گردد که فعالیت آنزیم را متوقف کرده و رنگ آبی را به زرد تبدیل می‌نماید که بهترین جذب نوری را در طول موج 450 nm دارد.

محتویات کیت:

- ۱) پلیت حاوی چاهک‌های پوشش داده شده با آنتی‌بادی ضد T4 (Anti-T4 Coated Plate).
- ۲) محلول آنزیم کوئزوگه (Enzyme Conjugate): ویال حاوی محلول T4 کوئزوگه شده با آنزیم HRP (آماده مصرف).
- ۳) اسی بافر (Assay Buffer): ویال حاوی محلول بافری آماده مصرف.
- ۴) سری استانداردها (Standards Set): ویال‌های استاندارد شامل غلظت‌های ۰، ۲، ۴، ۸، ۱۲ و ۲۰ میکروگرم بر دسی‌لیتر از T4.
- ۵) سرم کنترل (Control Serum): ویال حاوی سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال.
- ۶) محلول شستشو (Wash Solution): ویال حاوی محلول شستشوی غلیظ (20X)، به منظور 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 تترامیل‌بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده مصرف).
- ۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution): ویال حاوی اسید کلریدریک ۱ نرمال.
- ۹) برچسب مخصوص پلیت.
- ۱۰) دفترچه‌ی 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 فرانس).
- ۲) سمپلرهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری 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.
- 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 هر پرسنلی که با کیت کار می‌کند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزد.
- ۴) نمونه بیماران، استانداردها، کنترل‌ها و چاهک‌های 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.

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 یاد 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 ۸-۲ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و مصرف می‌باشد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

سرم یا پلاسما را می‌توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود. نمونه را می‌توان به مدت دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و یا برای مدت زمان طولانی‌تر (حداکثر ۳۰ روز) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری نمود. 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 درجه حرارت 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 متوقف کننده جذب نوری چاهک‌ها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می‌باشد.
- ۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهک‌ها به طور کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهک‌ها خارج شوند.
- ۶) 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.
- ۷) به دلیل مشابه در بند ۶ بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه‌ها بیش از ۵ دقیقه به طول نیانجامد.
- ۸) شستشوی صحیح با مقدار مناسب بافر شستشو جهت حصول نتایج قابل اعتماد بسیار ضروری است.

مراحل انجام آزمایش:

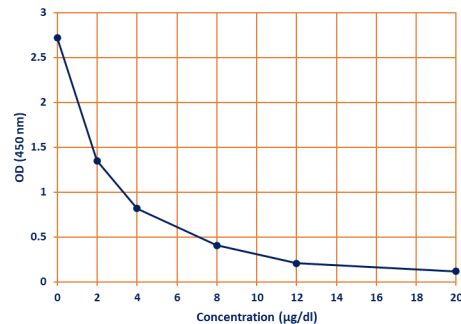
- ۱) تعداد چاهک‌های مورد نظر را انتخاب نموده و باقی چاهک‌ها را به همراه نم‌گیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید.
- ۲) ۲۵ میکرولیتر از هر استاندارد، سرم کنترل و نمونه را به داخل هر چاهک بریزید. پیشنهاد می‌گردد که از استانداردها و نمونه‌ها به صورت داپلیکیت استفاده شود، بدین معنی 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) را به هر چاهک اضافه کنید.
- ۳) مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه را به هر چاهک اضافه نمایید.
- ۴) پلیت را به مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهک‌ها خوب مخلوط شوند. سپس درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهک‌ها را به مدت ۱ ساعت در درجه حرارت اتاق (۲۸-۲۲ درجه سانتی‌گراد) و در تاریکی انکوبه نمایید.
- ۵) محتویات چاهک‌ها را خالی کرده و 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.
- ۷) چاهک‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید.
- ۸) 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 (ELISA Reader) با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نمایید (توصیه می‌شود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد).

محاسبه نتایج:

- از هر دستگاه الایزا ریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm می‌توان استفاده نمود.
- ۱) جذب نوری استانداردها و نمونه‌ها را به کمک دستگاه الایزا ریدر 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

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.)

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 می‌باشد و هر

آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

مقادیر مورد انتظار:

مقادیر نرمال T4 در سرم افراد سالم که توسط تست‌های مکرر به روش الایزا بدست آمده به قرار زیر می‌باشد ولی پیشنهاد می‌گردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد.

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

$$\mu\text{g/dl} \times 12.87 = \text{nmol/L}$$

$$\text{nmol/L} \times 0.078 = \mu\text{g/dl}$$

محدودیت‌های کیت T4:

با وجود استفاده از مواد بلاک‌کننده آنتی‌بادی‌های هتروقیل در محلول‌های کیت، به علت وجود آنتی‌بادی‌های هتروقیل با منشاءهای متفاوت در سرم افراد، امکان وجود نتایج کاذب وجود دارد. تفسیر تست‌های عملکرد تیروئیدی با نتایج یک تست امکان پذیر نبوده و نتایج این آزمایش باید با نتایج سایر تست‌های تیروئیدی 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) حداقل مقدار قابل اندازه‌گیری:

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و منهای سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت T4 قابل تشخیص در این کیت 0.4 µg/dl می‌باشد. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP17-A2 انجام شده است.

(۲) دقت آزمایش:

آزمایش‌های Inter Assay (هم‌خوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و Intra Assay (هم‌خوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایش‌های مختلف) با استفاده از ۳ سرم با غلظت‌های مختلف T4 انجام گردید که در جدول ۱ و ۲ آمده است.

جدول ۱ - اطلاعات Intra Assay

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 ۲ - اطلاعات Inter Assay

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

هر سری آزمایش به صورت داپلیکیت 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 ۳ آمده است. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP34 انجام شده است.

جدول ۳ - نتایج ریکاوری آزمایش.

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 استفاده از 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 ۴ نتایج آن آورده شده است. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP06-A انجام شده است.

جدول ۴ - نتایج بررسی خطی بودن آزمایش.

نمونه	مقدار T4 موجود در سرم رقیق نشده (µg/dl)				ریکاوری (%)
	رقت ۱:۲	رقت ۱:۴	رقت ۱:۸	رقت ۱:۱۶	
۱	۶	۹۵	۱۰۶	۹۱	—
۲	۹	۹۴	۹۱	۱۰۹	۱۰۵
۳	۱۲	۹۶	۹۰	۹۲	۹۱
۴	۱۸	۹۰	۹۴	۱۰۹	۱۰۷

۵) اختصاصیت آزمایش:

اختصاصیت این آزمایش به کمک سرم‌هایی با غلظت‌های مختلف 3,5-Diiodothyronine (T3), 3,3',5-Triiodothyronine (T3), 3,3',5'-Triiodothyronine (rT3), 3,3',5-Triiodothyropropionic acid و 3,3',5-Triiodothyro acetic acid به منظور بررسی واکنش‌های متقاطع با T4 سنجیده شد که نتایج آن در جدول ۵ آمده است. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP14-A3 انجام شده است.

جدول ۵ - اختصاصیت (واکنش متقاطع).

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

منابع:

- Liewendahl K: Assessment of thyroid status by laboratory methods: development and perspectives. Scand J Clin Invest 50 (Suppl 201): 83-92, 1990. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2244187/>)
- Cavaliere RR, Rapoport B: "Impaired peripheral conversion of Thyroxine to Triiodothyronine." Ann Rev Med 28:57-65, 1977. (<https://doi.org/10.1146/annurev.me.28.020177.000421>)
- Spector DA et al: "Thyroid function and metabolic state in chronic renal failure." Ann Int Med 85:724-730. (<https://doi.org/10.7326/0003-4819-85-6-724>)
- Burr WA et al: "Serum triiodothyronine and reverse triiodothyronine concentrations after surgical operation." Lancet II:1277-1279, 1975. ([https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(75\)90612-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(75)90612-1))

جدول علائم:

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

روش انجام آزمایش T4 به صورت شماتیک

چاهک‌های کوت شده با آنتی‌بادی برای 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. سپس دهانه چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید. ۱ ساعت 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 450 nm (و در صورت امکان 630 nm به عنوان فیلتر فرانس) خوانش کنید.			

جدول محتویات کیت

محتویات کیت	فرمت ۴۸ تستی	فرمت ۹۶ تستی	فرمت ۱۹۲ تستی
پلیت Plate	1x48-wells	1x96-wells	2x96-wells
محلول آنزیم کنژوگه Enzyme Conjugate	1x3 ml	1x6 ml	1x12 ml
سری استانداردها Standard Set	St.:6x0.5 ml	St.0: 1x1 ml Other St.:5x0.5 ml	St.0: 1x2 ml Other St.:5x1 ml
سرم کنترل Control Serum	1x0.5 ml	1x0.5 ml	1x1 ml
محلول اسی بافر Assay Buffer	1x3 ml	1x6 ml	1x12 ml
محلول رنگزای یک مرحله‌ای Chromogen - Substrate	1x6 ml	1x12 ml	2x12 ml
محلول شستشو Wash Solution	1x25 ml	1x50 ml	2x50 ml
محلول متوقف کننده Stop Solution	1x6 ml	1x12 ml	2x12 ml
برچسب مخصوص پلیت Cardboard Sealer	1	1	2
دستورالعمل استفاده Instruction for Use	1	1	1