

کیت اندازه گیری هورمون T4 در سرم انسان  
**T4 ELISA Kit**  
96 Tests: Cat. No: 0424-96  
192 Tests: Cat. No: 1924-192  
Rev: B4 (1404/09/08)

**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 پره‌آلبومین متصل شونده به تیروکسین و ۱۰ درصد با آلبومین پیوند برقرار می‌کند و حدود ۰/۰۳ درصد از T4 نیز به صورت آزاد در خون جریان دارد. T4 به‌عنوان پیش‌ساز و ذخیره هورمون فعال تیروئید (T3)، با دیدینه شدن در بافت‌ها به T3 تبدیل می‌شود که فعالیتی بسیار بیشتر از T4 دارد. اندازه‌گیری میزان T4 توتال به روش ایمنونواسی، تستی آسان و مطمئن جهت تشخیص نارسایی‌های تیروئید است. افزایش مقدار T4 در هیپرتیروئیدیسم، بیماری‌های Graves و تیروئیدیت‌های حاد رخ می‌دهد. مقدار پایین T4 نیز در هیپوتیروئیدیسم‌های مادرزادی، Myxedema، تیروئیدیت‌های مزمن (بیماری هاشیموتو) و یا دیگر نارسایی‌های ژنتیکی دیده می‌شود. حیطة کاربرد این کیت، اندازه‌گیری 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) به‌همراه نمونه سرم یا کالیبراتور و یا کنترل که حاوی T4 طبیعی (غیرکونژوگه) است، به چاهک‌های حاوی آنتی‌بادی تثبیت شده اضافه می‌شوند. در زمان انکوباسیون، با رقابت میان دو آنتی‌ژن برای اتصال به آنتی‌بادی‌های ضد T4 در سطح چاهک، کمپلکس‌های ایمنی تشکیل می‌شوند. پس از شستشوی چاهک‌ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود 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 نمونه‌ها و کالیبراتورها نسبت عکس دارد. در نهایت غلظت T4 موجود در نمونه‌ها توسط منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

**محتویات کیت:**

محتویات کیت	کیت ۹۶ تستی	کیت ۱۹۲ تستی
میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی آنتی‌بادی تثبیت شده.	یک عدد	دو عدد
کالیبراتورها (T4 Cal A-F). شش ویال با غلظت‌های ۰،۱۰، ۰،۲۰، ۰،۵، ۱،۰، ۰،۱۵، ۰،۲۵ و ۰،۵۰ µg/dL تهیه شده از سرم انسان	یک سری	یک سری
محلول کونژوگه آنزیمی (T4 Enzyme Conjugate)	یک ویال ۱/۵ میلی‌لیتری	یک ویال ۳ میلی‌لیتری
بافر رقیق کننده کونژوگه (Conjugate Diluent)	یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری	دو ویال ۱۲ میلی‌لیتری
محلول شستشو (Wash Solution-50X)	یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری	یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری
محلول رنگزا A (Substrate Solution A)	یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	دو ویال ۶/۵ میلی‌لیتری
محلول رنگزا B (Substrate Solution B)	یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	دو ویال ۶/۵ میلی‌لیتری
محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop Solution)	یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری	یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری
محلول کنترل (T4 Control)	ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری	ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری
برچسب مخصوص پلیت	۱ ورق	دو ورق

توجه ۱: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.

توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در 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).
- 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 نمایید.
- کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.
- توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.

۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBS Ag، HIV1/2 و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های 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 جداً جلوگیری کنید.

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

**جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:**

۱) نمونه مناسب برای این کیت، سرم است. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا گردد. 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 یک ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری نمایید.

**آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:**

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. به‌عنوان مثال، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از کونژوگه را به ۲ میلی‌لیتر 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) 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) آماده سازی محلول رنگزا: قبل از شروع استفاده از کیت، کل حجم محلول رنگزا B (ویال روشن) را داخل محلول رنگزا A (ویال تیره) خالی نمایید و برای انجام تست تا پایان مصرف کیت استفاده نمایید. 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 دمای تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، کنترل‌ها و نمونه‌ها 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 نمایید.  
۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور و یا کنترل به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.  
۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی آماده شده (بخش ۴) آماده سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه به‌آرامی روی سطح میز تکان دهید.  
۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید. چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش ۴ آماده سازی 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<sup>۱</sup> اقدام نمایید.

<sup>1</sup> <http://www.idealdiag.com/Training.aspx>

**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.

#### علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

<b>EC REP</b>	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
<b>LOT</b>	Batch code
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device
<b>CE</b>	European conformity
<b>REF</b>	Catalogue number
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

#### References:

- McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
- Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
- 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.

**توجه:** چنانچه از دستگاه‌های ایژا پروسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.

#### 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)	% Bias			
		1/2	1/4	1/8	1/16
1	4.1	2.5	-2.6	-2.2	-2
2	8.3	-1.8	3.7	-0.7	-2.1
3	15.6	-1	-1.8	-3.1	-1.4

#### ۵) 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
Diothyrosine	0.0001	100 µg/ml
Diiodothyronine	0.0001	100 µg/ml

#### ۶) 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.

$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

$$LOB = \text{Mean}_b + 1.645 SD_b$$

(s: DiLuted sample & b: BLank)

#### 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.

#### مقادیر مورد انتظار برای تست T4 به روش ایژا

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به فرار 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 نوبت‌کاری (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 T4 (µg/dL)	4.8	9.3	15.4
SD (µg/dL)	0.21	0.40	0.66
CV (%)	4.4	4.3	4.3

#### 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 نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) 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)	3.9	7.5	18.3
SD (µg/dL)	0.21	0.34	0.79
CV (%)	5.4	4.5	4.3

#### 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 به دست 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	12.7	3.3	8	7.99	99.8
2	6.1	12.3	9.2	9.1	98.9
3	3.3	6.3	4.8	4.9	102.0

۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزای آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید. پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور، کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۵ دقیقه افزایش دهید.

۷) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

۸) مقدار جذب نوری را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از روش Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج فرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه ارائه شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (µg/dL)
Cal. A	A1	2.376	2.394	0
	B1	2.412		
Cal. B	C1	1.891	1.925	2
	D1	1.959		
Cal. C	E1	1.481	1.498	5
	F1	1.516		
Cal. D	G1	1.045	1.053	10
	H1	1.062		
Cal. E	A2	0.792	0.812	15
	B2	0.832		
Cal. F	C2	0.548	0.567	25
	D2	0.586		

