www.padyabteb.com

T4

Thyroid ELISA Kits

REF: PT-ET4-102

IVD

مقدمه

تیروکسین یا ۳، ۵، ۳´، ۵´ – تترا یدو تیرونین (T4) هورمون اصلی غده تیروئید است، که توسط هیپوتالاموس و هیپوفیز با یک مکانیسم فیدبک حساس تنظیم می‌شود. TRH تولید شده توسط هیپوتالاموس با تحریک هیپوفیز باعث رهاسازی TSH شده که خود با اثرگذاری بر تیروئید باعث آزادسازی T4 و T3 می‌شود. دو هورمون تیروئیدی T3 و T4 توسط مکانیسم فیدبک، ترشح TSH و TRH را کنترل می‌کنند. بیش از ۹۹ درصد T4 به پروتئین پلاسمائی مانند گلبولین اتصالی به تیروکسین (TBG) (۷۰ درصد)، پره آلبومین (۲۰ درصد) و آلبومین (۱۰ درصد) متصل می‌باشد. بنابراین مقدار آزاد T4 کمتر از ۰/۱% از کل T4 می‌باشد. T4 آزاد به علت اتصال به TBG وارد سلول‌ها شده و اثر بیولوژیکی خود را اعمال می‌کند.

اندازه گیری T4 توتال توسط روش‌های ایمونواسی قابل اطمینان‌ترین آزمایش غربالگری برای تشخیص اختلالات تیروئیدی در بیماران است. افزایش T4 در پرکاری تیروئید (هیپرتیروئیدی) ناشی از بیماری‌های گریو (Grrave)، پلومر (Plummer)، تومورهای تروفوبلاستی و تیروئیدیت مشاهده می‌شود. غلظت‌های پایین T4 (هیپوتیروئیدی) با کم کاری تیروئید مادرزادی، میکزودم، تیروئیدیت مزمن (بیماری هاشیماتو) و برخی اختلالات ژنتیکی در ارتباط است.

اساس روش اندازه‌گیری

این تســت به کمک آنتی بادی مونوکلونال به روش رقابتی طراحی شده است.

در این تست چاهک ها توسط مونوکلونال آنتی بادی T4 پوشش داده می‌شوند.مقدار مشخصی سرم و آنتی ژن T4 کونژوگه شده با آنزیم HRP به چاهک ها اضافه می شــود.جهت اندازه گیری غلظت توتال T4 و جداسازی T4 از پروتیین‌های پلاسما از ANS (۸ – آنیلینو – ۱ – نفتالن ســولفونات) استفاده می‌شــود. HRP-T4 و T4 موجود در سرم و استاندارد جهت اتصال به آنتی بادی مونوکلونال T4 موجود در چاهک‌ها در زمان انکوباسیون باهم رقابت می‌کنند.

پــس ازگذشــت زمــان انکوباســیون (۴۵ دقیقه) در دمــای اتاق و شستشــو چاهک‌ها توسط محلول شستشــو دهنده و اضافه کردن محلــول رنگزا و انکوباســیون به مــدت ۱۵ دقیقه رنــگ آبی ظاهر مــی گردد. بــا اضافه کردن محلول متوقف کننــده رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شود. شدت رنگ در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری می‌گردد.

واکنش آنزیمی و تشــکیل رنگ با میزان غلظت T4 موجود در سرم رابطه عکس دارد.

محتویات کیت

ردیف	نام محصول	حجم/ تعداد
1	پلیت پوشانده شده با آنتی بادی مونوکلونال Anti-T4 (Anti-T4 Coated plate)	1X96 test
2	محلول آنزیم کونژوگه آماده مصرف (T4 Enzyme conjugate)	1X12 ml
3	استاندارد در غلظت 0.0 µg/dl (Cal T4 0.0 µg/dl/)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 2.5 µg/dl (Cal T4 2.5 µg/dl)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 5.0 µg/dl (Cal T4 5.0 µg/dl)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 10 µg/dl (Cal T4 10 µg/dl)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 15 µg/dl (Cal T4 15 µg/dl)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 30 µg/dl (Cal T4 30 µg/dl)	1X0.5 ml
4	بافر شستشوی غلیظ 20X (Wash Buffer)	1X30 ml
5	محلول سوبسترا – رنگزا (Chrom Substrte)	1X11ml
6	محلول متوقف کننده (Stop Solution)	1X6 ml
7	سرم کنترل به همراه نگهدارنده (Control serum)	1X0.5 ml
8	برچسب مخصوص پلیت	۱ عدد

+ محلول شستشو، رنگزا و متوقف کننده در همه کیت‌ها مشترک می‌باشند.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند

1- سمپلرهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری

2- آب مقطر

3- دستگاه الایزا ریدر

4- کاغذ جاذب رطوبت

نگهداری کیت

1- کیت در یخچال در دمای ۸°c–۲ نگهداری شود.

2- میکروپلیت‌ها باید در کیسه در بسته به همراه نمگیر نگهداری شود.

3- مدت زمان پایداری کیت تا پایان تاریخ انقضا (یکسال از زمان تولید) نوشته شده برروی برچسب کیت می‌باشد.

4- کیت باز شده حداقل به مدت ۲ ماه در دمای ۸°c–۲ پایدار خواهد بود.

5- محلول شستشوی رقیق شده به نسبت ۱ به ۲۰ به مدت یک هفته در دمای ۸°c–۲ قابل نگهداری و مصرف می‌باشد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه

پس از جداســازی ســرم از نمونه خون بیمار، نمونــه را می‌توان به مدت ۴۸ ســاعت در درمای ۸°c–۲ نگهداری نمود. جهت نگهداری طولانی‌تر، نمونه‌ها باید در دمای ۲۰°c– نگهداری شوند. نمونه‌های ذوب شده باید قبل از آزمایش مخلوط شوند. بهتر است ترجیحاً از نمونه‌های با کدورت بالا، همولیز و لیپمیک استفاده نشود. در ضمن باید از فریز و ذوب مکرر نمونه‌ها (Freeze-Thaw) اجتناب گردد.

نکات قابل توجه

1- کیت فقط جهت استفاده در آزمایشگاه تشخیصی کاربرد دارد.

2- استفاده از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه جهت دقت و صحت بیشتر.

3- شستشو چاهک‌ها به صورت کامل جهت نتیجه بهتر.

- بررسی چاهک‌ها از نظر وجود حباب.
- خارج کردن حباب از چاهک‌ها با زدن ضربه آهسته به پلیت.

4- عدم ترکیب اجزاء کیت با سری ساخت متفاوت.

5- جلوگیری از تعویض درب معرف‌ها.

6- جلوگیری از تماس معرف به ویژه معرف متوقف‌کننده واکنش با پوست (در صورت تماس با آب کافی شستشو داده شود).

7- از استعمال دخانیات، خوردن و آشامیدن اجتناب شود.

8- از پی‌پت کردن مواد با دهان پرهیز شود.

9- از دستکش و لباس مناسب استفاده شود.

+ جهت ســاخت برخی از اجزای این کیت از سرم انسانی که از نظر HCV، HbsAg، HIV منفی می‌باشد، استفاده شده است.

آماده سازی معرف‌ها

1- همه معرف‌ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (۳۰–۱۸ درجه سانتی گراد) برسند.

2- تهیه محلول شستشو: برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمائید.

نکته‌های مهم

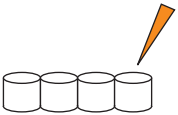
1- توصیه می‌شود که بیشتر از ۳۲ چاهک در هر ران کاری استفاده نشود. اگر پی‌پت به صورت دستی انجام می گیرد، پی‌پت کردن همه استانداردها، نمونه‌ها ، کنترل‌ها باید در ۵ دقیقه تمام شود. برای پی‌پت کردن کل پلیت ۹۶ تستی باید از دستگاه اتوماتیک استفاده شود.

2- فرایند شستشو خیلی مهم است. شستشوی ناکافی باعث کاهش دقت و افزایش کاذب جذب می شود.

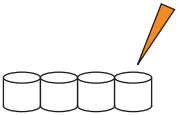
روش انجام آزمایش

1- تعداد چاهک‌های کوت شده برای استانداردها، کنترل و نمونه‌های بیمار را بصورت دوتایی انتخاب کنید و مابقی چاهک‌ها را در کیسه مخصوص به همراه نمگیر قرار داده و درب آن را ببندید.

2- ۲۵µl استانداردها، سرم کنترل و نمونه‌ها به چاهک‌ها اضافه نمایید.



3- ۱۰۰µl آنزیم کونژوگه HRP به تمام چاهک‌ها اضافه نمایید.



4- پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید و سپس درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.

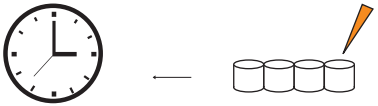
5- محتویات چاهک‌ها را خالی کنید و چاهک‌ها را ۵ بار با ۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشوی آماده شستشو دهید. سپس چاهک‌ها را وارونه کنید و همراه با تکان دادن خالی کنید و در انتهای شستشو با ضربات ملایم بر روی کاغذ جاذب تمامی مایع موجود در چاهک‌ها را تخلیه نمایید.

محتویات چاهک‌ها تخلیه شود

۵ بار شستشو با ۳۵۰ میکرولیتر بافر

به وسیله کاغذ جاذب خشک کنید

6- ۱۰۰µl از سوبسترای آماده مصرف به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید.



۱۰۰ λ محلول سوبسترای (TMB)

۱۵ دقیقه انکوبه در دمای اتاق ۲۵ °C

7- ۵۰ µl از محلــول متوقف کننده به همــه چاهک‌ها اضافه کنید. سپس جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت کنید. ســنجش جذب نــوری باید حداکثر تا ۱۵ دقیقه پس از انجام آزمایش انجام شود.

۵۰ میکرولیتر محلول STOP به تمام چاهک‌ها

ELISA READER

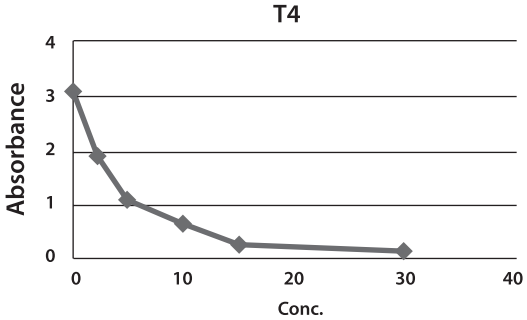
محاسبه‌نتایج

1- با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها (محور Y) و غلظت مشـخص آنها (محور X) برروی کاغذ میلی‌متری، منحنی استانداردی رسم کنید.

2- میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سـپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

راهنمای محاسبه

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



ردیف	مقدار استاندارد (µg/dl)	جذب
۱	۰	۳/۰۷۰
۲	۲/۵	۱/۸۵۰
۳	۵	۱/۱۱۲
۴	۱۰	۰/۶۵۰
۵	۱۵	۰/۲۹۸
۶	۳۰	۰/۱۷۴

مقادیر طبیعی

بدلیل اختلافات سـنی، نژادی و رژیم تغذیـه، نمی‌توان برای تمام جمعیت‌ها محدوده مرجع تعیین کرد. بنابراین هر آزمایشـگاه باید محدوده مرجع خود را گزارش نماید. مقادیر طبیعی در سـرم افراد نرمال که توسـط آزمایشات مکرر به روش الایزا بدست آمده است به قرار زیر می‌باشد:

محدوده طبیعی : ۱۲/۶ µg/dl – ۴/۵

خصوصیات کیت

1-حساسیت آنالیتیکال (حد تشخیص) :

برای تعیین حد تشـخیص ۲۰ مرتبه استاندارد صفر آزمایش شد. حـد تشـخیص از ۲ انحراف معیار (SD) بالاتـر از میانگین جذب در غلظت صفر بدسـت آمد. حد تشـخیص برای این کیت ۱/۰ µg/dl بدست آمد.

2- دقت:

برای محاسـبه میزان دقت در یـک روز (درون سـنجی) و روزهای مختلف، (میان سـنجی) آزمایش بر روی ۳ نمونه سرم ۲۰ بار تکرار شد که ضریب تغییرات به شرح ذیل است.

دقت درون سنجی				
نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (µg/dl)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
۱	۲۰	۳/۸۲	۰/۳۹	۱۰
۲	۲۰	۸/۱	۰/۴۳	۵.۳
۳	۲۰	۱۳/۷	۱/۰۷	۷.۷

دقت میان سنجی				
نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (µg/dl)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
۱	۲۰	۳/۸۴	۰/۲۴	۶/۲
۲	۲۰	۸	۰/۶۸	۸/۵
۳	۲۰	۱۴/۵	۰/۳۹	۲/۷

3- ویژگی:

واکنش متقاطع T4 با هورمون های T3 و rT3 به وسیله اضافه کردن این هورمون‌ها به استاندارد صفر تعیین گردید.

نوع ماده	غلظت	درصد تداخل
T3	۵۰۰ng/ml	۱/۰۶
rT3	۵۰۰ng/ml	۰/۸۴

4- خطی بودن:

سه نمونه مختلف سرمی با استاندارد صفر به نسبت‌های ۱:۲ ، ۱:۴ و ۱:۸ رقیق شـدند. سـپس غلظت T4 در آنها با اسـتفاده از کیت محاسبه شد که نتایج ذیل بدست آمد.

نمونه سرمی	غلظت اولیه (µg/dl)	درصد خطی بودن		
		۱:۲	۱:۴	۱:۸
۱	۱۵/۵	۱۰۵	۹۶/۹	۹۷/۵
۲	۱۴/۷	۱۰۳	۹۸/۶	۹۴/۲
۳	۱۶/۰	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.

5. کتاب جامع الایزا – دکتر ناصر ملک نیا

پاره‌ای نکات علمی در خصوص رفع مشکلات احتمالی در کیت‌های الایزا :

	علت مشکل	راه حل
پایین بودن OD استانداردها و نمونه‌ها	افت و یا آلودگی کونژوگه	تکرار تست با کونژوگه جدید
	پایین بودن دما و یا کوتاه بودن زمان انکوباسیون، به دما نرسیدن محلول‌های کیت و نمونه بیماران	• دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید • قبل از شروع آزمایش کیت و نمونه بیماران به دمای اتاق برسد.
	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها	• PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. • پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	• پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه‌کنید. • پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.

	طول موج خوانش نامناسب (۴۰۵ نانومتر بجای ۴۵۰ نانومتر)	• تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. • طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
عدم تولید رنگ در چاهک‌ها	استفاده از مواد سایر کیت‌ها	تکرار تست با مواد همان کیت
	انجام نشدن مرحله‌ای از تست	تکرار تست
	آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید	تکرار تست با محلول کونژوگه جدید
منحنی نبودن نمودار	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید

صحیح نبودن نمودار	پی‌پتینگ نامناسب	• استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف. • از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده‌کنید. • توجه کنید نوک سمپلر محکم به‌سمپلر متصل باشد. • توجه کنید در هنگام پی‌پتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود.
	PH نامناسب و یا غلظت بالای، Wash Buffer	PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید.
	شستسوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها	پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید.

بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD	آلودگی استاندارد صفر	تکرار تست با استانداردهای جدید
	آلودگی محلول رنگزا	استفاده از محلول رنگزا جدید
	آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نا مناسب	• عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. • تمام سوزن‌های دستگاه واشر را چک کنید.
	طول موج نامناسب در خوانش	• تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. • طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. • از فیلتر ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید.

	آلودگی محلول Stop	تکرار تست با محلول Stop جدید
	ایجاد وقفه در خوانش	بلافاصله بعد از Stop کردن تست، یا حداکثر تا ۱۵ دقیقه پلیت را بخوانید.
عدم تکرار پذیری مناسب	پی‌پتینگ نا مناسب	• استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف • از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید. • توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. • توجه کنید در هنگام پی‌پتینگ حباب وارد نشود. • توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد. • کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلرها.

عدم تکرار پذیری مناسب	طولانی شدن زمان انجام تست	فاصله زمانی بین اضافه کردن استانداردها و نمونه نباید بیشتر از ۱۰ دقیقه باشد. در این صورت نتایج قابل اعتماد نیست.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	• پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. • پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.
	باقی ماندن کونژوگه در لبه چاهک‌ها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها.	پی‌پتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	وجود حباب در چاهک‌ها	در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک‌ها نباشد.
	کثیف بودن کف چاهک‌ها	کف چاهک‌ها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید.
	مخلوط نشدن محلول‌های کیت	قبل از استفاده از ویال محلول‌ها را به آرامی تکان دهید.

خلاصه روش آزمایش

معرف‌ها	استانداردها	نمونه‌ها
استانداردها	۲۵µl	–
نمونه‌ها	–	۲۵µl
کونژوگه	۱۰۰µl	۱۰۰µl

در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه نمایید.

۵ بار با ۳۵۰µl محلول بافرشستشو رقیق شده، شستشو دهید و با دقت محتویات را خالی کنید.

محلول رنگزا	۱۰۰µl	۱۰۰µl

به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی انکوبه نمایید.

محلول متوقف کننده	۵۰µl	۵۰µl

جـذب نوری هر چاهـک در طول موج ۴۵۰ nm و فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm قرائت شود.

www.padyabteb.com

PADYABTEB
Producer of Diagnostic Products

دفتر فروش و خدمات پس از فروش:

تهران . خیابان ولی‌عصر (عج). بالاتر از میدان ونک . خیابان عطار . ضلع جنوبی میدان عطار.
پلاک ۳۲. طبقه دوم **تلفن:** ۸۸۶۴۹۰۷۶ (۰۲۱) **خدمات پس از فروش:** ۰۹۱۲۹۴۰۹۱۲۴

کارخانه:

شهرک صنعتی اشتهارد . بلوار ابوریحان بیرونی . بلوار غزالی غربی . خیابان لادن ۲
تلفن: ۸ ـ ۳۷۷۷۵۵۳۱ (۰۲۶) **فکس:** ۳۷۷۷۵۵۲۹ (۰۲۶)

TRANSPACIFIC CERTIFICATION
TCL
ISO 13485:2012

GMP
IQC Intelligent Quality Control
Pharmaceutical Industry Quality Management

ISO 9001:2015
IQC Intelligent Quality Control
Quality Management System

ISO 10002:2014
IQC Intelligent Quality Control
Customer Quality Management System

eztest
ELISA Kits