

www.padyabteb.com

eztest
ELISA Kits

T3 Uptake
Thyroid ELISA Kits

REF: PT-ETU-106

IVD

◀ مقدمه

هورمون‌های تیروئیدی به دلیل حلالیت کمی که در محیط‌های آبی دارند، به طور عمده به پروتئین‌های حامل مانند گلوبولین تیروکسین، پره‌آلبومین و آلبومین متصل می‌شوند. درصد بسیار کمی از این هورمون‌ها بصورت آزاد در جریان خون وجود دارند، که این قسمت عامل فعالیت‌های بیولوژیکی این هورمون‌ها می‌باشد. مقدار آزاد هورمون‌های تیروئیدی نسبت عکس با مقدار متصل شده به پروتئین‌های سرم دارد. بیمار آن مبتلا به پرکاری تیروئید غلظت‌های بالایی از هورمون‌های تیروئیدی دارند، لذا پروتئین‌های سرم این افراد نسبت به افراد طبیعی اشباع‌تر می‌باشند. بالعکس افراد مبتلا به کم‌کاری تیروئید، غلظت‌های کمتری از هورمون‌های تیروئیدی را داشته، لذا پروتئین‌های سرم این افراد نسبت به افراد طبیعی کمتر اشباع می‌باشد. در برخی حالات پاتولوژیک غلظت پروتئین‌های سرم افزایش می‌یابد که در نتیجه آن غلظت تام هورمون‌های تیروئیدی (بویژه T4) افزایش می‌یابد، در حالی‌که عملکرد تیروئید طبیعی است. لذا تعیین مقدار برداشت هورمون‌های تیروئیدی (T-Uptake) همراه با تعیین مقدار تام هورمون‌های تیروئیدی در شرایط خاص نشانگر بهتری برای ارزیابی عملکرد تیروئید می‌باشد.

◀ اساس روش اندازه‌گیری

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

به این ترتیب که چاهک‌ها با آنتی بادی Anti-T4 پوشش داده شده است.

در هنگام انجام آزمایش هورمون T4 به همراه T4 کوئز وگه شده با آنزیم HRP-T4 و سرم به چاهک‌ها اضافه می‌شوند. تیروکسین موجود در مجموعه جهت اتصال به آنتی‌بادی پوشش داده شده و ظرفیت خالی پروتئین‌های سرم رقابت می‌کند و همچنین آنتی بادی پوش داده شده جهت اتصال به کوئز وگه آنزیمی و تیروکسین موجود رقابت می‌کند.

پس از گذشت زمان انکوباسیون (۴۵ دقیقه) در دمای اتاق و شستشو چاهک‌ها توسط محلول شستشو دهنده و اضافه کردن محلول سوپسترا و محلول رنگزا و انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه رنگ آبی ظاهر می‌گردد. با اضافه کردن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شود. شدت رنگ در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری می‌گردد.

میزان پروتئین ای حامل با کمکس‌های آنزیم دار و رنگ واکنش رابطه عکس دارند.

◀ 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 کوئز وگه آماده مصرف (T4 Enzyme conjugate)	1X12 ml
3	استاندارد در غلظت 15% (Cal T4 15%)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 25% (Cal T4 25%)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 35% (Cal T4 35%)	1X0.5 ml
4	استاندارد در غلظت 45% (Cal T4 45%)	1X0.5 ml
	بافر شستشوی غلیظ 20X (Wash Buffer)	1X30 ml
5	محلول سوپسترا - رنگزا (Chrom Substrate)	1X11 ml
6	محلول متوقف کننده (اسیدکلریدریک یک نرمال) (Stop Solution)	1X6 ml
7	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 ۰.۲۵، ۰.۵۰ و ۱.۰۰ میکرولیتری
- 2- آب مقطر
- 3- دستگاه الیزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری به عنوان فیلتر رفرنس
- 4- کاغذ جاذب رطوبت

◀ جمع آوری و آماده سازی نمونه

پس از جداسازی سرم از نمونه خون بیمار، نمونه را می‌توان به مدت ۴۸ ساعت در درمای 8°C – 2°C نگهداری نمود. جهت نگهداری طولانی‌تر، نمونه‌ها باید در دمای 20°C – 2°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

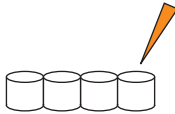
- 1- کیت فقط جهت استفاده در آزمایشگاه تشخیصی کاربرد دارد.
 - 2- استفاده از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه جهت دقت و صحت بیشتر.
 - 3- شستشو چاهک‌ها به صورت کامل جهت نتیجه بهتر.
 - بررسی چاهک‌ها از نظر وجود حباب.
 - خارج کردن حباب از چاهک‌ها با زدن ضربه آهسته به پلیت.
 - 4- عدم ترکیب اجزاء کیت با سری ساخت متفاوت.
 - 5- جلوگیری از تعویض درب معرف‌ها.
 - 6- جلوگیری از تماس معرف به ویژه معرف حاوی اسیدکلریدریک 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 کلاه مناسب استفاده شود.
- + جهت ساخت برخی از اجزای این کیت از سرم انسانی که از نظر HIV، HbsAg، HCV منفی می‌باشد، استفاده شده است.

◀ نگهداری کیت

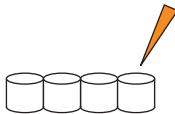
- 1- کیت در یخچال در دمای 8°C – 2°C نگهداری شود.
- 2- میکروپلیت‌ها باید در کیسه در بسته به همراه نمگیر نگهداری شود.
- 3- مدت زمان پایداری کیت تا پایان تاریخ انقضا (یکسال از زمان تولید) نوشته شده بر روی برچسب کیت می‌باشد.
- 4- کیت باز شده حداقل به مدت ۲ ماه در دمای 8°C – 2°C پایدار خواهد بود.
- 5- محلول شستشوی رقیق شده به نسبت ۱ به ۲۰ به مدت یک هفته در دمای 8°C – 2°C قابل نگهداری و مصرف می‌باشد.

◀ روش انجام آزمایش

- 1- انتخاب تعداد چاهک‌های کوت شده برای استانداردها، کنترل و نمونه‌های بیمار بصورت دوتایی و قرار دادن مابقی چاهک‌ها در کیسه مخصوص به همراه نمگیر و بستن درب آن.
- 2- این ۲۵ استانداردها، کنترل و نمونه‌ها به چاهک‌ها اضافه نمایید.



- 3- این ۱۰۰ μl آنزیم کوئز و گه HRP به تمام چاهک‌ها اضافه نمایید.



- 4- پلیت را به مدت ۱۵ 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 جذب تمامی مایع موجود در چاهک‌ها را تخلیه نمایید.

◀ آماده سازی معرف‌ها

- 1- همه معرف‌ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (۲۵-۱۸ درجه سانتی‌گراد) 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 نمایید.

◀ نکته‌های مهم

- 1- توصیه می‌شود که بیشتر از ۳۲ چاهک در هر ران کاری استفاده نشود. اگر پلیت به صورت دستی انجام می‌گیرد، پلیت کردن همه استانداردها، نمونه‌ها، کنترل‌ها باید در ۵ دقیقه تمام شود. برای پلیت 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 می‌شود.

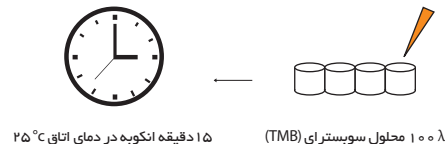
محاسبه نتایج

1- با استفاده از میانگین جذب نوری استاندارد‌ها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) بر روی کاغذ میلی‌متری، منحنی استاندارد را رسم کنید.

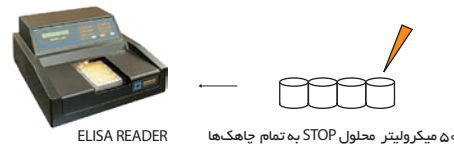
2- میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.



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



7- ۵۰ μl از محلول متوقف کننده به همه چاهکها اضافه کنید. سپس جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر قرائت کنید (در صورت امکان از طول موج ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید). سنجش جذب نوری باید حداکثر تا ۱۵ دقیقه پس از انجام آزمایش انجام شود.



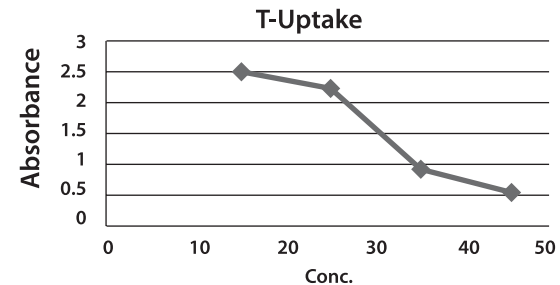
◀ مقادیر طبیعی

بدلیل اختلافات سنی، نژادی و رژیم تغذیه، نمی‌توان برای تمام جمعیت‌ها محدوده مرجع تعیین کرد. بنابراین هر آزمایشگاه باید محدوده مرجع خود را گزارش نماید. مقادیر طبیعی در سرم افراد نرمال که توسط آزمایشات مکرر به روش الیزا بدست آمده است به قرار زیر می‌باشد:

محدوده طبیعی: ۳۵% - ۲۵%

◀ راهنمای محاسبه

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



جذب نوری	مقدار استاندارد (%)	ردیف
۲/۵	۱۵	۱
۲/۲	۲۵	۲
۰/۹	۳۵	۳
۰/۵	۴۵	۴

◀ خصوصیات کیت

1- دقت:

برای محاسبه میزان دقت در یک روز (درون سنجی) و روزهای مختلف، (میان سنجی) 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 (%)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
۱	۲۰	۲۲/۴	۱/۶۰	۷/۱
۲	۲۰	۳۳/۱	۱/۹۰	۵/۷
۳	۲۰	۴۶/۲	۲/۱۱	۴/۶

دقت میان سنجی				
نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (%)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
۱	۲۰	۲۰/۵	۱/۸۰	۸/۷
۲	۲۰	۳۳/۰	۱/۹۲	۵/۸
۳	۲۰	۴۶/۰	۲/۷۳	۶/۰

+ References

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.

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

<ul style="list-style-type: none"> • تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. • طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. 	<p>طول موج خوانش نامناسب (۴۰۵ نانومتر بجای ۴۵۰ نانومتر)</p>	عدم تولید رنگ در چاهک‌ها
<p>تکرار تست با مواد همان کیت</p>	<p>استفاده از مواد سایر کیت‌ها</p>	
<p>تکرار تست</p>	<p>انجام نشدن مرحله‌ای از تست</p>	صحیح نبودن نمودار
<p>تکرار تست با محلول کوثر و گه جدید</p>	<p>آلودگی محلول کوثر و گه با سدیم آزاید</p>	
<p>از سری استاندارد جدید استفاده کنید</p>	<p>آلودگی استانداردها</p>	

راه حل	علت مشکل	پایین بودن OD استاندارد‌ها و نمونه‌ها
<p>تکرار تست با کوثر و گه جدید</p>	<p>افت و یا آلودگی کوثر و گه</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید • قبل از شروع آزمایش کیت و نمونه بیماران به دمای اتاق برسد. 	<p>پایین بودن دما و یا کوتاه بودن زمان انکوباسیون، به دما نرسیدن محلول‌های کیت و نمونه بیماران</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • 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. 	<p>PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • 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. 	<p>نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد</p>	

تکرار تست با استانداردهای جدید	آلودگی استاندارد صفر
استفاده از محلول رنگزا جدید	آلودگی محلول رنگزا
<ul style="list-style-type: none"> 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. 	آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نامناسب
<ul style="list-style-type: none"> تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. از فیلتر ۰.۲۳ میکرومتر به عنوان فیلتر رفرنس استفاده کنید. 	طول موج نامناسب در خوانش

بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD

<ul style="list-style-type: none"> 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 نوک سمپلر نشود. 	پیپتینگ نامناسب
<ul style="list-style-type: none"> PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. 	PH نامناسب و یا غلظت بالای، Wash Buffer
پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهکها بلافاصله تست را ادامه دهید.	شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهکها

صحیح نبودن نمودار

فاصله زمانی بین اضافه کردن استانداردها و نمونه نباید بیشتر از ۱۰ دقیقه باشد. در این صورت نتایج قابل اعتماد نیست.	طولانی شدن زمان انجام تست
<ul style="list-style-type: none"> پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضای توجه کنید. پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید. 	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد
پیپتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهکها بلافاصله تست را ادامه دهید.	باقی ماندن کوثر و گه در لبه چاهکها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهکها.
در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهکها نباشد.	وجود حباب در چاهکها
کف چاهکها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید.	کثیف بودن کف چاهکها
قبل از استفاده از ویال محلولها را به آرامی تکان دهید.	مخلوط نشدن محلولهای کیت

عدم تکرار پذیری مناسب

تکرار تست با محلول Stop جدید	آلودگی محلول Stop
بلافاصله بعد از Stop کردن تست، یا حداکثر تا ۱۵ دقیقه پلیت را بخوانید.	ایجاد وقفه در خوانش
<ul style="list-style-type: none"> 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. 	پیپتینگ نامناسب

عدم تکرار پذیری مناسب

« خلاصه روش آزمایش

نمونه‌ها	استانداردها	معرفها
-	۲۵µl	استانداردها
۲۵µl	-	نمونه‌ها
۱۰۰µl	۱۰۰µl	کوثر و گه

در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه نمایید.
 ۵ بار با ۳۵۰µl محلول بافر شستشو رقیق شستشو دهید و با دقت
 محتویات را خالی کنید.

۱۰۰ µl	۱۰۰ µl	محلول رنگزا
--------	--------	-------------

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

۵۰ µl	۵۰ µl	محلول متوقف کننده
-------	-------	-------------------

جذب نوری هر چاهک در طول موج ۴۵۰ nm و فیلتر رفرانس
 ۶۳۰ nm قرانت شود.



دفتر فروش و خدمات پس از فروش:

تهران . ۲۴ متری سعادت آباد . خیابان یکم شرقی . خیابان شب بوشرفی . پلاک ۱۷
طبقه دوم . واحد ۸ . تلفن: ۴۲۰۸۷۳۰۰ (۰۲۱) . خدمات پس از فروش: ۰۹۱۲۹۴۰۹۱۲۴

کارخانه:

شهرک صنعتی اشتهارد . بلوار ابوریحان بیرونی . بلوار غزالی غربی . خیابان لادن ۲
تلفن: ۳۷۷۷۵۵۳۱ - ۸ (۰۲۱) . فکس: ۳۷۷۷۵۵۲۹ (۰۲۱)

