راهنمای کیت T4

مقدمه:

T4 توسط غده تیروئید ساخته می شود و توسط هیپوتالاموس و هیپوفیز با یک مکانیسم فیدبک منفی حساس تنظیم می شود. TRH تولید شده توسط هیپوتالاموس با تحریک هیپوفیز باعث رها سازی TSH شده که خود با تاثیر روی غده تیروئید باعث آزاد سازی T4 و T3می گردد که این دو نیز توسط مکانیسم فیدبک ترشح TSH وTRH را کنترل می کنند.T3 و T4 در کبد به فرم هاي سولفاته گلوگورونه کنژوگه مي شوند که این کنژوگه ها داخل صفرا شده و به روده مي روند. هورمونهاي تيروئيدي هيدروليز شده بعدها دوباره جذب ميشوند. سلول هاي تيروئيد يد پلاسمهائي را به Iodine تبديل كرده و سپس Iodine را روي آمينو اسيد تيروزين مولكول تيرو گلوبولين در موقعيت هاي 3و5 قرار مي دهند كه منجر به ساخته شدن (MIT,DIT) مي شودكه از لحاظ بيولوژيک غير فعالند.از ادغام دو ملکول DIT هورمون T4 تشکیل می شود. T4 غالبا به پروتئین های پلاسما مثل TBG متصل است که ظرفیت بالائی برای اتصال با T4 دارد. پس مقدار آزاد T4 کمتر از 0.1% است. T4 آزاد به علت اتصال به TBG وارد سلولها شده و اثر بیولوژیکی خود را اعمال می کند.

کاربرد بالیني آزمایش:

تعیین مقدار T4 در ارزیابی عملکرد تیروئید مفید است. در هیپرتیروئیدیسم ناشی از گواتر مولتی ندولر ،آدنوما ،تومورهای تروفوبلاستی و تیروئیدیت مقادیر T4 بالا میرود. در هیپو تیروئیدیسم ناشی از آتروفی اولیه تیروئید ،تیروئیدیت مزمن ،کمبود ید متعاقب جراحی ،رادیولوژی و نارسائی هیپوفیز کاهش T3 99.97% وT4 بصورت باند با TBG وTBPA و آلبومین وجود دارد.

محدوده طبیعی:

بزرگسالان	14-4 µg/dl
کودکان	15.3-6.4 µg/dl

اساس آزمایش :

اساس این کیت به روش رقابتی می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادی منوکلونال بر علیه یک واحد آنتی ژنیک T4 , Coat میشوند. استاندارد ها ونمونه بیماران با آنتی بادی Coat شده در چاهکها مجاور می شود و سپس محلول اسی بافر (assay buffer) و در پی آن کنژوگه T4 به چاهکها اضافه میشوند که این T4 کنژوگه با T4 موجود در نمونه در اتصال به آنتی بادی های کوت شده در چاهکها رقابت می کند.بنابراین هر چه مقدارT4 در نمونه بیشتر باشد مقدار T4 کنژوگه کمتری به آنتی بادی های کوت شده متصل می گردد وبالعکس. در ادامه پس از شستشو ، محلول رنگزا که حاوی H2O2 و کرومؤژن است به داخل چاهکها ریخته میشود و تولید رنگ آبی می کند که رنگ آبی تولید شده به صورت معکوس با غلظت T4 موجود در نمونه ها متناسب است. با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل میشود که بهترین جذب نوری را در طول موج 450 نانومتر دارد.

جمع آوري و آماده سازي نمونه :

نمونه سرم ارجح است ولي از پلاسماي هپارينه يا همراه با EDTA هم استفاده كرد ،سرم T4 خيلي پايداراست و مي تواند به مدت 7 روز در دماي اتاق ويا براي مدت طولاني تر دريخچال و 20- نگهداري شود(حد اکثر تا 30 روز). از فریز و ذوب کردن نمونه باید اجتناب کرد.

واکنش تداخلی:

داروهای آمیودارون ، آسپرین ، دانازول ، پروپرانولول بالا برنده T4 هستند وآنتی اپی لپسی ها(ضد صرع ها)مثل فنی توئین و کاربامازین پائین آورنده اند.

محتویات کیت :

1- یک عدد پلیت حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد T4 (Anti –T4 coated Plate) دارای 96 چاهک
2- سری استاندارد (Standard Set) : 6 ویال استاندارد دارای غلظت های µg/dl صفر، 1.5، 3، 6، 12،20 که هر ویاال محتوی 0.5 میلی لیتر می باشد.
3- سرم کنترل (Control Serum) : یک ویال حاوی 0.5 میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص نوشته شده روی برچسب ویال
4- محلول رقیق کننده نمونه ها (Sample Diluent) : یک ویال حاوی 1 میلی لیتر برای رقیق کردن نمونه هائی که غلظت بالاتری از بالاترین استاندارد کیت را دارا می باشند.
5- محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی 6 میلی لیتر محلول حاوی T4 کنژوکه شده با HRP .
6- محلول اسی بافر (Assay Buffer) : یک ویال حاوی 6 میلی لیتر محلول.
7- محلول شستشو (Washing Solution) : یک ویال حاوی 40 میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (25 X) که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف مقدار لازم از محلول شستشوی غلیظ را به نسبت 1/25 با آب مقطر رقیق کنید.
8- محلول رنگزا (Chromogen Substrate) : یک ویال محتوی 12 میلی لیتر و آماده برای مصرف.
9- محلول متوقف کننده (Stop Solution) :یک ویال محتوی 12 میلی لیتر.
10- بر چسب مخصوص پلیت (Card Board Sealer)

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشد:

1- دستگاه خوانش الایزا (Eliza Reader) دارای فیلتر 450 نانومتر ودر صورت امکان 630 به عنوان فیلتر رفرانس.
2- سمپلر های 25 و50 و 100 میکرولیتر دقیق
3- آب مقطر

نکات قابل ذکر براي مصرف كنندگان :

1- محتويات اين كيت براي مصرف در همين كيت مي باشد .
2- از مخلوط كردن محتويات كيتها باشماره ساختهاي مختلف جدا" خودداري نمائيد .
3- كليه مواد موجود در كيت كه منشاء سرمي دارند از نظر وجود HIV,HCV, HBs AG كنترل گرديده اند و فاقد اين عوامل مي باشند . جهت احتياط بهتراست هر كاربري كه با كيت كار مي كند از تماس مستقيم با مواد بپرهيزد .

توضيحات عمومي:

1- قبل از شروع مراحل آزمايش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق رسانده و به خوبي تكان دهيد تا كاملا" يكنواخت شوند.
2- بهتراست به محض شروع آزمايش كليه مراحل بدون توقف انجام پذيرند .
3- ازنوك سمپلر يك بار مصرف براي هر نمونه استفاده كنيد .
4- پس از افزودن محلول متوقف كننده ، جذب نوري چاهكها حداكثر تا نيم ساعت قابل قرائت مي باشد .
5- براي كسب نتايج مطلوب بايد شستشوي چاهكها بصورت كامل صورت گرفته وآخرين قطرات پس از شستشو از چاهكها تخليه شوند .
6- از مهمترين فاكتورها در حصول نتيجه مطلوب ، زمان انكو باسيون مناسب مي باشد ، بنابراين پيشنهاد مي گردد قبل از شروع آزمايش تمام مواد و محلولهاي مورد نيازرا آماده نموده و درب محلولهاي مورد نياز را باز كنيد ، اين عمل با كاهش فاصله زماني بين مراحل سمپلينگ باعث نتايج دقيقتري ميشود.
7- بهتر است كه حجم انجام تست محدود باشد وزمان ريختن نمونه ها پيش از5دقيقه به طول نيانجامد .

مراحل انجام آزمايش :

1- تعداد چاهكهاي مورد نظر را انتخاب نموده و باقي چاهكها را به همراه نمگير درون كيسه مخصوص نگهداري پليت قرار داده و درب آن را ببنديد .
2- 25 ميكروليتر از هر استاندارد ، سرم كنترل و نمونه را به داخل هر چاهك بريزيد ، سپس پليت را به آرامي به مدت 15 ثانيه تكان دهيد تا محتويات آن بخوبي مخلوط شوند ، پيشنهاد مي گردد كه از استانداردها و نمونه ها به صورت داپليكيت استفاده شود بدين معني كه هر استاندارد و نمونه را در دوچاهك بريزيد و در انتها از ميانگين جذب نوري آنها براي محاسبه نتايج استفاده كنيد سپس 50 ميكروليتر محلول اسي بافر(Assay buffer) ودر پي آن50 ميكرو ليترمحلول (Enzyme Conjugate) آنزيم كونزوگه به هرچاهك اضافه نمائيد وبراى 15 ثانيه پليت را تكان دهيد تا محتويات چاهكها خوب مخلوط شوند و آنگاه درب چاهكها را با بر چسب مخصوص پليت پوشانده و چاهكها را به مدت 1 ساعت در درجه حرارت اتاق(28-22 درجه) انكوبه نمائيد.
3- محتويات چاهكها را خالي كرده و چاهكها را 5 بار با محلول شستشوي آماده مصرف بشوئيد (براي شستشو مي توان از سمپلر 8 كانالـه استفاده نمود ولي بايد مواظب بود كه محلول شستشو از يك چاهك به چاهك ديگر وارد نشود زيرا مي تواند موجب ايجاد خطا در نتيجه آزمايش گردد). در هر دفعه شستشو حدود 300 ميكروليتر محلول شستشو در هر چاهك ريخته و سپس چاهك ها را درحالت وارونه و با ضربات ملايم بر روي يك پارچه يا كاغذ نمگير بكوبيد تا قطرات اضافي محلول شستشو خارج شوند.
4- 100 ميكروليتر محلول رنگزا (Chromogen – Substrate) به هرچاهك اضافه نمائيد و چاهكها را به مدت 15 دقيقه در درجه حرارت اتاق و درتاريكي انكوبه نمائيد .
5- با اضافه كردن 100 ميكروليتر محلول متوقف كننده (Stop Solution) به هرچاهك ادامه واكنشهاي آنزيمي را متوقف نمائيد . براي سنجش جذب نوري هرچاهك از دستگاه الايزا ريدر با فيلتر 450 nm استفاده نمائيد .
(توصيه مي شود از فيلتر 630 nm به عنوان فيلتر رفرانس استفاده گردد.)

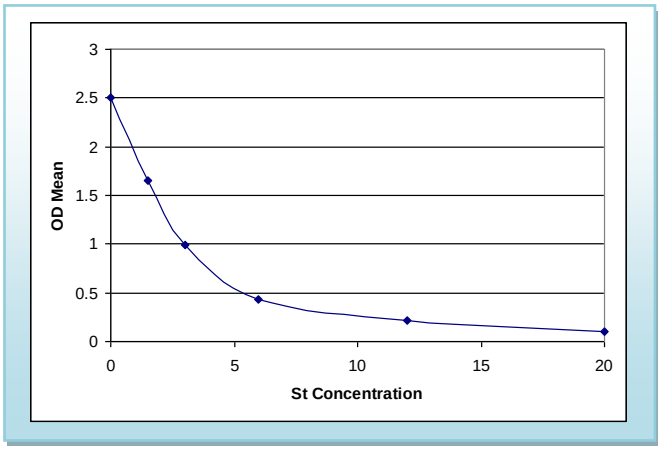
شرايط نگهداري فرآورده تشخيصي:

1- دماي نگهداري كيت بين 2-8 C' مي باشد و بهتراست كه در 4C ' نگهداري شود .
2- با توجه به انجام تست هاي accelerate , Full Term اين كيت درصورت رعايت موارد نگهداري صحيح تا 12 ماه پايدار مي باشد ودر اين مدت كيت حاضر بالاي 90 درصد كارايي اوليه را داراست. با توجه به آزمايشات انجام شده در صورت باز نمودن كيت يک ماه پايدار مى باشد .
3- چاهكها را در كيسه مخصوص پليت همراه با نمگير نگهداري نمائيد .
4- **توجه :** درصورت بازشدن درب كيت و محلول ها تازماني كه آلودگي ميكروبي و قارچي رخ ندهد كيت پايدار خواهند بود.

محاسبه نتايج :

1- جذب نوری استاندارد ها و نمونه ها را به کمک دستگاه Eliza Reader در طول موج nm450 و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس nm630 بخوانید.
2- با استفاده از میانگین جذب نوری استاندارد ها 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 ،در ادامه نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمائید تا منحنی بدست آید.
3- 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 نمائید بطوریکه این خط کاملا بر محور عمودی عمود باشد و در ادامه 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.

	استانداردها (µg/dl)	جذب نوری
St 1	0	2.5
St 2	1.5	1.65
St 3	3.0	0.99
St 4	6.0	0.43
St 5	12	0.22
St 6	20	0.1



توجه : جذب های نوری و منحنی مربوط فقط به عنوان نمونه می باشند و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

شاخصهاي اجرائي:

1- حداقل مقدار قابل اندازه گيري :

براساس جذب نوري استاندارد صفر و سه برابر انحراف معيار (SD) حداقل غلظت T4 قابل تشخيص در اين كيت 0.4 µg/dl مي باشد .

2- دقت آزمايش :

آزمايشهاي اينترا- اسي (همخواني غلظت مشخص از يك نمونه در يك سري آزمايش) و اينتر- اسي (همخواني غلظت مشخص ازيك نمونه در سري آزمايشهاي مختلف) بااستفاده از 4 استاندارد با غلظتهاي مختلف T4 انجام گرديد كه در جداول 1و2 آمده است .

جدول شماره 1 (اينترا- اسي)

نمونه	تعداد دفعات تكرار	ميانگين µg/dl	SDµg/dl	CV%
1	12	0	167.9	8.1
2	12	1.5	125.2	8.3
3	12	6.0	24.6	6.8
4	12	20	8.4	9.0

جدول شماره 2 (اينتر- اسي)

نمونه	تعداد دفعات تكرار	ميانگين µg/dl	SD µg/dl	CV%
1	5	0	155.2	7.7
2	5	1.5	112.3	6.5
3	5	3.0	90.4	5.1
4	5	6.0	27.1	8.6

هرسري آزمايش بصورت Duplicate انجام شده است .

3- ريكاوري آزمايش :

مقادير معلومي از T4 به 4 سرم با غلظتهاي مشخص T4 افزوده شد و ريكاوري آنها محاسبه گرديد كه نتايج آن در جدول زير آمده است .

جدول ريكاوري :

نمونه	مقدار T4 موجود درسرم (µg/dl)	مقدار افزوده شده T4 (µg/dl)	مقدار مورد انتظار (µg/dl)	مقدار بدست آمده (µg/dl)	ريكاوري (%)
1	2.2	1.5	1.95	1.8	92
1	2.2	6	4.1	3.9	95
1	2.2	20	11.1	10.8	97
2	3.5	1.5	2.5	2.2	88
2	3.5	6	4.75	4.85	102
2	3.5	20	11.75	11.2	95
3	6.6	1.5	4.05	4.0	98
3	6.6	6	6.3	6.0	95
3	6.6	20	13.3	12.4	93
4	10.5	1.5	6	5.5	91
4	10.5	6	8.25	7.9	95
4	10.5	20	15.25	13.5	88

4- خطي بودن آزمايش :

به كمك استاندارد صفر رقتهاي متوالي 4 نمونه استاندارد با غلظت مشخص از T4 تهيه گرديد و نتايج بر اساس ضريب رقت محاسبه شد كه درجدول زير نتايج آن آورده شده است .

جدول خطي بودن :

نمونه	مقدار T4موجود در سرم رقيق نشده (µg/dl)	ريكاوري (%)			
		رقت 25%	رقت 50%	رقت 75%	100%
1	3.0	92	90	102	94
2	6.0	90	93	96	96
3	20	92	95	91	92

5- اختصاصيت آزمايش :

اختصاصيت اين آزمايش به كمك سرمهايي با غلظتهاي مختلف 3,5-Diiodothyronine و 3,3`,5-Triiodothronine(T3) و 3,3`,5`Triiodonine(rT3) و 3,3`,5-Triiodothyro acetic acid و 3,3`,5-Triiodothyropioonic acid جهت بررسي واكنشهاي متقاطع با T4 بررسي شد كه نتايج آن در جدول زير آمده است .

جدول اختصاصيت (واكنش متقاطع) :

آناليت	غلظت(nmol/L)	غلظت ظاهري T4 (µg/dl)
3,5-Diiodothyronine	1000	<0.4
3,3`,5-Triiodothronine(T3)	100	<0.4
3,3`,5`Triiodonine(rT3)	100	<0.4
3,3`,5-Triiodothyro acetic acid	100	<0.4
3,3`,5-Triiodothyropioonic و	100	<0.4

References
1. Barjer, S.B., 1948. Determination of protein bound iodine. J. Biol. Chem. 173,175.
2. Chopra, I.j., Solomon, D.H. and Ho, R.S., 1971. A radioimmunoassay of triiodothyronine. J. Clin. Endocrinol. 33,865.
3. Young D.S., Prstaner, L.C. and Gilberman, U. 1975. Effects of drugs on clinical laboratory tests. Clin. Chem. 21, 3660.
4. Sterling, L. 1975. Diagnosis and treatment of thyroid disease, Cleveland CRC Press, 19-51.

Adress :
No:1161 , Bid Avenue , Payetakht , Industrial zone , Tehran , Iran
Tel : +98 21 66 56 91 84 - 66 59 37 41 Fax : +98 21 66 56 14 28
Email : info@biokarpira.com
www.biokarpira.com

043 ISO 9001-2008 13485