کیت ایمونو آنزیماتیک (EIA) پادتن علم

T4

☐ ۹۶ تستی ☐ ۱۹۲ تستی

موارد استفاده :
تعیین کمّی **T4** در سرم یا پلاسما

I. مقدمه

هورمون تیروکسین(3,3′,5.5′ -L-tetraiodothyronine یا T4)عمده ترین هورمون مترشحه از غده تیروئید بوده و کنترل آن توسط یک مکانیسم فیدبک منفی انجام می گیرد. ابتدا سنتز TSH توسط هورمون آزاده کننده تیروتروپین (HRT) تحریک می‌شود. سپس TSH آزاد شده پس از واکنش با گیرنده‌های اختصاصی جدار سلولهای تیروئید موجب ترشح هورمونهای T3 و T4 می گردد. [۱-۵]

بیش از ۹۹/۹٪ از کل T4 سرم به پروتئینهای پلاسما (Binding hyroxinTBG-T globulin) که ظرفیت بالایی برای اتصال به T4 دارند، متصل است. در نتیجه فقط کمتر از ۰/۱٪ از کل T4 آزاد بوده و فعالیت متابولیکی دارد. هر چند این ظرفیت اتصالی در افراد سالم غالباً ثابت باقی می‌ماند، ولی در دوران حاملگی، هیپرپروتئینمی، بیماریهای وراثتی با میزان TBG بالا، مصرف استروژن یا مصرف داروهای ضد بارداری این ظرفیت پایین‌تر بوده و در نتیجه میزان کل T4 به طور کاذب بالاتر می‌باشد. در موارد TBG پائین (هیپوپروتئینمی، آکرومگالی، برخی بیماریهای کلیوی، کبدی و گوارشی و نیز بدخیمی ها) میزان کل T4 به طور کاذب پایین‌تر است. در این موارد، جهت بررسی عملکرد تیروئید اندازه‌گیری مقدار کل T4 به تنهایی کافی نمی‌باشد. [۶-۹]

به طور معمول در سرم افراد مبتلا به هیپرتیروئیدیسم مقدار T4 افزایش یافته و در افراد مبتلا به هیپوتیروئیدیسم مقدار آن کاهش می‌یابد.

از آنجایی که کاهش یا افزایش T4 نشان دهنده انواع نارسائی‌های تیروئیدی، هیپوتالاموسی و هیپوفیزی است، در صورت نرمال بودن مقدار TBG، اندازه‌گیری T4 در ارزیابی عملکرد تیروئید مفید بوده و در تشخیص افتراقی این بیماریها حائز اهمیت می‌باشد. [۱۰-۱۲]

II. اصول اندازه گیری

کیت اندازه‌گیری کمّی T4 بر مبنای سنجش واکنش رقابتی ایمونوآنزیماتیک بر روی فاز جامد طراحی شده است. در این سیستم، نمونه بیمار و مقدار ثابتی از T4 متصل به آنزیم پراکسید از (HRP) به حفره‌های پلی استرین پوشیده شده با آنتی‌بادی‌های ضد T4 افزوده می‌شود. در حین انکوباسیون T4 موجود در سرم بیمار با T4-HRP برای تشکیل پیوند با آنتی‌بادی‌های ضد T4 وارد رقابت می‌شود. در نتیجه مقدار T4-HRP متصل به Ab-T4 با میزان T4 موجود در سرم نسبت معکوس دارد. پس از انکوباسیون مقادیر اضافی T4-HRP و T4 موجود در سرم از طریق شستشو از سیستم خارج می‌شود، سپس افزودن سوبسترای TMB (۳ و ۳´ - ۵ و ۵´ تترامتیل بنزیدین) سبب ایجاد رنگ آبی توسط آنزیم می‌شود. شدت رنگ ایجاد شده با میزان T4 موجود در نمونه‌ها نسبت عکس دارد. رنگ‌زائی واکنش آنزیماتیک توسط محلول متوقف کننده خاتمه یافته و رنگ آبی ایجاد شده به رنگ زرد مبدل می‌شود.

شدت رنگ به وسیله یک اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. برای تعیین غلظت T4 نمونه‌ها ابتدا منحنی جذب نور استانداردها برحسب غلظت T4 آنها رسم شده و سپس میزان غلظت T4 نمونه از روی منحنی استاندارد تعیین می گردد.

III. محتویات کیت

تاریخ انقضا بر روی اجزا کیت(Cat.No.P-T4) درج شده است. دمای مناسب برای نگهداری کیت ۸-۲درجه سانتی گراد است.

محتویات کیت ۹۶ تستی

۱. **پلیت:** پلیت ۹۶ حفره‌ای پوشش داده شده با آنتی‌بادی‌های منو کلنال ضد T4 موش.

۲. **استانداردها:** ۶ ویال ۱ میلی لیتری استاندارد T4 حاوی سرم انسانی. غلظت دقیق T4 استانداردها بر روی برچسب آنها درج شده است.

۳. **کنترل‌های سرمی:** ۲ ویال ۱میلی لیتری سرم کنترل حاوی T4 و سرم انسانی. غلظت دقیق T4 کنترل‌ها بر روی برچسب آنها درج شده است.

۴. **ردیاب آنزیمی :** یک ویال ۱۲ میلی لیتری T4 متصل به پراکسیدار (HRP) محلول در بافر، حاوی پروتئین و تیمروزال.

۵. **محلول شستشوی غلیظ (۲۰×)**: یک ویال ۱۲ میلی لیتری PBS-Tween 20 و تیمروزال.

۶. **محلول رنگ زا:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری بافر H_2O_2 و TMB.

۷. **محلول متوقف کننده واکنش:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری H_2SO_4 دو نرمال.

محتویات کیت ۱۹۲ تستی

۱. **پلیت :** دو پلیت ۹۶حفره‌ای پوشش داده شده با آنتی‌بادی‌های منو کلنال ضد T4 موش.

۲. **استانداردها:** ۶ ویال ۱ میلی لیتری استاندارد T4 حاوی سرم انسانی.
غلظت دقیق T4 استانداردها بر روی برچسب آنها درج شده است.

۳. **کنترل های سرمی:** ۲ ویال ۱ میلی لیتری سرم کنترل حاوی T4 و سرم انسانی. غلظت دقیق T4 کنترل‌ها بر روی برچسب آنها درج شده است.

۴. **ردیاب آنزیمی :** یک ویال ۲۵ میلی لیتری T4 متصل به پراکسیدار (HRP) محلول در بافر، حاوی پروتئین و تیمروزال.

۵. **محلول شستشوی غلیظ (۲۰×)**: یک ویال ۲۵ میلی لیتری PBS-Tween20 و تیمروزال.

۶. **محلول رنگ زا:** یک ویال ۲۵ میلی لیتری بافر H_2O_2 و TMB.

۷. **محلول متوقف کننده واکنش:** یک ویال ۲۵ میلی لیتری H_2SO_4 دو نرمال.

VI. وسایل مورد نیاز(این وسایل همراه کیت عرضه نمی شوند):

۱. دستگاه اسپکتروفتومتر میکروپلیت با دامنه جذب نوری ۰-۳ در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰.

۲. میکروپیپت قابل تنظیم بر روی ۲۵ و ۱۰۰ میکرولیتر و تیپ های یکبار مصرف

۳. آب مقطر یا آب دیونیزه برای رقیق کردن محلول شستشو.

V. نحوه جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه ها :

نمونه مناسب جهت اندازه‌گیری T4، سرم یا پلاسمای هپارینه بیمار می‌باشد. این نمونه‌ها به مدت یک هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری است. برای نگهداری نمونه‌ها به مدت طولانی‌تر، سرم یا پلاسمای بیمار را در حجم‌های کم تقسیم نموده، در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری نمائید. بهتر است از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه‌ها اجتناب نمود. برای اندازه‌گیری T4 نمونه‌های منجمد شده، ابتدا نمونه را در حرارت اتاق ذوب نموده، سپس با حرکت دست یکنواخت نمایید. برای یکنواخت کردن نمونه‌ها از Vortex استفاده ننمائید. برای اندازه‌گیری دقیق نمونه‌هائی که میزان T4 آنها بیش از آخرین استاندارد است، ابتدا نمونه‌ها را با سرم انسانی(با غلظت کمتر از (0.4 µg/dl) رقیق کرده، سپس اندازه‌گیری مجدد به عمل آورید. بدیهی است در محاسبه نتایج این نمونه‌ها، ضریب رقت منظور می‌شود.

VI. روش کار :

قبل از شروع کار دمای تمامی محلولها باید به دمای اتاق برسد.

یک حجم از محلول شستشوی غلیظ را با ۱۹ حجم آب مقطر یا دیونیزه رقیق نمائید. این محلول به مدت ۷ روز در درجه حرارت ۸-۲ درجه سانتی گراد پایدار است. در صورت مشاهده کریستال در محلول غلیظ شستشو، ویال را به مدت چند دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید تا محلول یکنواخت گردد.

۱. ابتدا ۲۵ میکرو لیتر از استانداردها،کنترل های سرمی و سرم بیماران را در داخل حفره ها ریخته، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه T4 را به حفره های مربوطه اضافه نمائید.

۲. جهت کسب نتیجه مطلوب محتویات پلیت را بر روی میز تکان داده و به خوبی مخلوط نمائید.

۳. پلیت را با برچسب مخصوص پوشانده و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق $24 \pm 3^{\circ}C$ قرار دهید. دمای خارج از محدوده تعریف شده، می تواند در نتایج تست تاثیر گذار باشد.

۴. حفره ها را ۴بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشوئید.

۵. به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای TMB اضافه نمائید.

۶. پلیت را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و در محلی تاریک قرار دهید.

۷. ۱۰۰میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش را در هر حفره ریخته و به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط کنید.

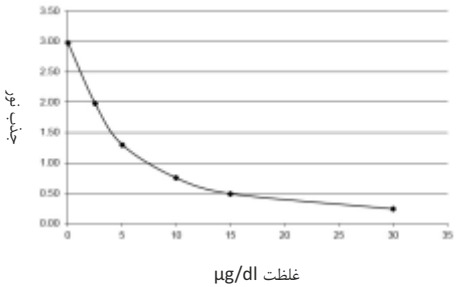
۸. میزان جذب نوری حفره ها را در طول موج ۴۵۰نانومتر (با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده بخوانید.

VII. محاسبه نتایج :

پس از تعیین میزان جذب نوری استانداردها و نمونه ها و ترسیم منحنی، غلظت T4 بیماران قابل محاسبه است. در این منحنی که با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (قابل برنامه ریزی) و یا به صورت دستی ترسیم می شود، محور Y شاخص میزان جذب نور استانداردهای T4 در طول موج nm۴۵۰ و محور X شاخص غلظت استانداردهای T4 بر حسب µg/dl می باشد. نتایجی که در جدول زیر آمده، فقط به عنوان مثال بوده و نباید بعنوان نتایج حاصل از آزمایش تلقی شود.

غلظت T4 (mg/dl)	جذب نور	نمونه	
۰/۰	۲/۹۸	استاندارد	A
۲/۵	۱/۹۸	استاندارد	B
۵/۰	۱/۳۰	استاندارد	C
۱۰/۰	۰/۷۵	استاندارد	D
۱۵/۰	۰/۴۹	استاندارد	E
۳۰/۰	۰/۲۴	استاندارد	F
۸/۵	۰/۹۰	سرم	

برای ترسیم منحنی از ارزش های مندرج بر روی ویال استانداردها استفاده نمائید.



VIII. مقادیر طبیعی :

با استفاده از سرم ۱۹۲ فرد بالغ سالم، مقادیر طبیعی T4 توسط کیت پادتن علم تعیین گردیده است. نتایج بدست آمده از این آزمایشات نشان می دهد که غلظت T4 ۹۵٪ از این افراد بین ۴/۹ µg/dl تا ۱۲/۲ با میانگین ۸/۵ mg/dl می باشد.

توصیه می گردد هر آزمایشگاه با در نظر گرفتن غلظت سرمی T4 افراد سالم، دامنه طبیعی آن را تعیین نموده و از آن به عنوان مبنای مقایسه خود استفاده نماید.

IX. ویژگی های اختصاصی تست :

۱. **حساسیت:** حداقل غلظت T4 قابل اندازه گیری با این کیت ۰/۴ µg/dl می باشد.

۲. **اختصاصی بودن:** اختصاصی بودن کیت T4 پادتن علم با تعیین درصد تداخل پس از افزودن مواد مندرج در جدول زیر تعیین گردیده است. درصد تداخل نسبت غلظت T4 به غلظت ماده افزوده شده که جایگزین ۵۰٪ از T4-HRP در واکنش بین پیوند T4-HRP و Ab anti T4 گردد، می باشد.

نتایج درصد تداخل به شرح زیر می باشد.

ماده افزوده شده	درصد تداخل (Cross-reactivity)
L-Thyroxine	۱۰۰
D-Thyroxine	۵۹
L-Triiodo Thyronine	۰/۹
D-Triiodo Thyronine	۰/۴
3,5-Diiodo-L-Thyronine	< ۰/۰۱
Diiodo Thyrosine	< ۰/۰۱
Mono iiodo Thyrosine	< ۰/۰۱
Reverse Triiodo Thyronine	۳/۱

۳. **مقایسه با روش الکترو کمی لومینسانس T4:** برای بررسی همبستگی آماری بین کیت EIA پادتن علم و کیت Roche Elecsys، غلظت T4 ۱۰۰۰ نمونه تصادفی با هر دو کیت اندازه گیری شد. مقایسه نتایج به دست آمده، ضریب همبستگی ۰/۹۷ را نشان دهید.

۴. **دقت:** شاخص دقت کیت با مقایسه تکرارپذیری جواب ها به روش میان سنجی (Inter-assay) و درون سنجی (Intra-assay) تعیین گردیده است. برای این منظور ۳ نمونه سرم (Low,Normal,High) ده بار در یک آزمایش (درون سنجی) و یک بار در ده دوره آزمایش متفاوت (میان سنجی) تعیین غلظت شده است. نتایج انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات (CV) در جدول زیر امده است.

جدول شاخص دقت

سرم	درون سنجی			میان سنجی		
	میانگین (mg/dl)	SD	%CV	میانگین (mg/dl)	SD	%CV
Low	۳/۷	۰/۴	۱۲/۵	۳/۰	۰/۵	۱۵/۵
Normal	۹/۹	۰/۷	۷/۶	۸/۶	۰/۲	۲/۲
High	۲۱/۲	۰/۷	۳/۱	۳۱/۵	۰/۷	۲/۴

۵. **بررسی رقت:** برای بررسی خطی بودن رقتهای T4 چندین نمونه سرمی غلیظ پس از رقیق شدن متوالی با سرم انسانی که غلظت T4 آن کمتر از ۰/۴ µg/dl بوده، اندازه گیری شده است. نتایج بدست آمده از رقت ۲ نمونه سرمی در جدول زیر آمده است.

جدول رقت

رقت		رقیق نشده	۱:۲	۱:۴	۱:۸
غلظت پیش بینی شده	S1	۳۱/۲	۱۵/۶	۷/۸	۳/۹
	S2	۳۵/۶	۱۷/۸	۸/۹	۴/۴
غلظت اندازه گیری شده	S1	-	۱۴/۷	۷/۹	۳/۴
	S2	-	۱۸/۷	۹/۳	۴/۲
٪ ریکاوری	S1	-	۹۴/۲	۱۰۱	۸۷
	S2	-	۱۰۵	۱۰۴	۹۵

X. References

1. Chen IW, Sperling MI. Thyroxine. In: Kaplan La, Pesce AJ, des. Clinical chemistry: theory, analysis, and correlation. 2nd edition. St. Louis: CV Mosby, 1989:956-59.
2. Watts NB, Keffer JH. Practical endocrine diagmosis. 3rd edition. Philadelphia: Lea and Febiger, 1982:1-27.77-96.
3. Chattorag SC, Watts NB. Endocrinology. In: Tietz NW, ed. Fundamentals of clincal chemistry. 3rd edition. philadelphia: WB Saunders, 1987:584-92.
4. Albertini A, Ekins RP, editors. Free hormones in blood. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1982
5. Robbins J, Rall JE. The iodine-containing hormones. In: Gray CH, James VHT, editors. Hormones in blood. London: Academic Press 1979:575-688.
6. Gershengom MC, Glinoer D, Robbins J. Transport and metabolism of thyroid gland. New York: Raven Press. 1980:81-121.
7. Prince HP, Ramsden DB. A new theoretical description of the binding of thyroid hormones by serum proteins. Clin Endocrinol 1977;7:307-24
8. Refetoff S. Thyroid Hormone transport. Endocrinology. Philadelphia: Grune and Stratton, 1979;1:347-56.
9. Robbins J, Johanson ml. Theoretical considerations in the transport of thyroid hormoes in blood. In: Ekins RP, deitor. Free thyroid hormones. Amsterdam: Excerpta Medica, 1979-1-16
10. Slag MF, Morley JE, Elson MK, et al. Hypothyroxinemia in crtically ill patients as a predictor of high mortaliyt. JAMA 1981;245:43-5
11. Waltish PG. Thyroid physiology. and pathology. In: Collu R Jr, Ducharme H, Guyda, editors. Pediatric endocrinology. New York: Raven Press, 1981:357-31
12. EVERED, D.C. Diseases of the thvroid gland. Clinics in Endocrinology and Metabolism, 1974,3,pp.425-450.
13. Burtis, C.A., Ashwood, E. R. Tietz Fundamentals of clinical Chemistry, 4th edition: 789, 1999

احتیاط!

با توجه به اینکه محلول‌های به‌کار رفته در این کیت‌ها حاوی مواد سمی مانند تیمروزال و مواد پروتئینی با منشا انسانی و حیوانی هستند، و اینکه با هیچ تستی نمی توان از عدم وجود ویروس‌هایی چون HCV ، HBV، HIV در این محلول‌ها اطمینان کامل حاصل کرد، خواهشمند است هنگام کار احتیاط‌های لازم از جمله استفاده از دستکش، امتناع از خوردن و آشامیدن و سیگار کشیدن، خودداری از پیپت کردن با دهان و پرهیز از هرگونه تماس محلول با چشم و دست‌ها، رعایت شود.

Rev: Jul.2020

تهران ۱۴۱۶۸ ، خیابان طالقانی غربی ، خیابان شهید سرپرست(کیوان جنوبی) ، پلاک ۲۶
تلفن و فکس : ۶۳۴۸۱(۰۲۱)