راهنمای کیت
T-UPTAKE

مقدمه:
هورمونهای تیروئیدی به دلیل حلالیت کم در محیط آبی بطور عمده به پروتئین های حامل مانند TBG و Alb وPre Alb متصل می شوند. در سنجش میزان تام هورمونهای تیروئیدی چنانچه افزایش میزان تام هورمون با افزایش پروتئین های حامل همراه باشد با ثابت ماندن بخش آزاد و فعالیت فیزیولوژیک طبیعی ،فرد مشکل تیروئیدی نخواهد داشت. به عبارت دیگر تغییر صحیح میزان تام هورمون های تیروئیدی منوط به روشن بودن وضعیت پروتئین های حامل است. لذا آزمون های مختلفی برای تخمین میزان این پروتئین ها طراحی شده اند از جمله آزمون برداشت تیروئیدی.

محدوده طبیعی:
مقادیر نرمال T-Uptake در سرم افراد طبیعي که توسط تست هاي مکرر به روش الایزا بدست آمده به شرح زیر می باشد ولي پیشنهاد مي گردد تا هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد:

محدوده طبیعی %	37-21 درصد

اساس آزمایش :
اساس این کیت به روش رقابتی می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادی ضد T4 , Coat میشوند. و در هنگام انجام آزمایش هورمون T4 به همراه T4 کنژوگه شده با HRP و سرم به چاهکها اضافه میشوند.در این هنگام پروتئین های حامل هورمون های تیروئیدی بر حسب ظرفیت خود مقداری از هورمون T4 را جذب می نمایند، ولی نمی توانند با هورمون T4 کنژوگه واکنشی نشان دهند در نتیجه مقداری از T4 که جذب پروتئین های حامل نگردیده است بر سر اتصال به آنتی بادی های کف چاهک با T4 کنژوگه رقابت می نماید، بنابراین هر چه ظرفیت حمل پروتئینهای سرم بالاتر باشد مقدار T4 کمتری برای رقابت با T4 کنژوگه باقی مانده ودر رقابت با آن در اتصال به آنتی بادی های کف چاهکها ناموفق تر خواهد بود و بالعکس ، پس از شستشو محلول سوبسترا به چاهک ها اضافه می گردد که هر چه میزان رنگ زائی بیشتر باشد بیانگربالاتر بودن میزان اتصال هورمون T4 کنژوگه بوده و به این معنی است که مقدار T4 برداشت شده توسط پروتئین های حامل بالا بوده بنابراین مقدار کمتری T4 برای رقابت باقی مانده است وبالعکس ، برای جلوگیری از فعالیت بیش از اندازه و نا مناسب آنزیم ، محلول متوقف کننده افزوده می گردد که فعالیت آنزیم را مختل کرده ورنگ آبی را به زرد تبدیل می نماید که بهترین جذب نوری را در طول موج 450 نانومتر دارد.

جمع آوري و آماده سازي نمونه :
سرم یا پلاسما در دمای 2 تا 8 درجه سانتیگراد به مدت دو روز و برای مدت بیشتر در 20- درجه نگهداری شود.

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) : 4 ویال استاندارد دارای غلظت های 13،23،33،43 که هر ویال محتوی 0.5 میلی لیتر می باشد.
3- محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی 12 میلی لیتر محلول آماده مصرف.
4- 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.
5- محلول رنگزا (Chromogen Substrate) : یک ویال محتوی 12 میلی لیتر و آماده برای مصرف.
6- محلول متوقف کننده (Stop Solution) :یک ویال محتوی 12 میلی لیتر.
7- 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

نكات قابل ذكر 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 100 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(22-28 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 كاناله 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 می باشد .
3- چاهكها را در كيسه مخصوص پليت همراه با نمگير نگهداري نمائيد .

توجه : درصورت بازشدن درب کیت و محلول ها تازماني که آلودگي ميکروبي و قارچي رخ ندهد کيت پايدار خواهند بود.

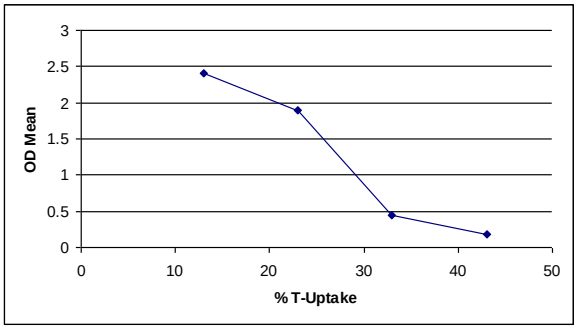
محاسبه نتایج :

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	OD 450/630
St 1	13	2.4
St 2	23	1.9
St 3	33	0.45
St 4	43	0.185



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- 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 T-UPTAKE انجام گرديد كه در جداول 1و2 آمده است .

جدول شماره 1 (اينترا- اسي)

نمونه	تعداد دفعات تكرار	ميانگين %	SD	CV%
1	12	13	0.65	3.1
2	12	23	0.88	4.3
3	12	33	0.96	6.8
4	12	43	0.75	2.0

جدول شماره 2 (اينتر- اسي)

CV%	SD	ميانگين %	تعداد دفعات تكرار	نمونه
3.7	0.65	13	5	1
3.5	1.45	23	5	2
4.1	1.23	33	5	3
2.6	0.9	43	5	4

هرسري آزمايش بصورت Duplicate انجام شده است .

References
1. Inada, M. and Sterling K. (1967) J. Clin. Invest. 46,1442
2. Murphy, B., (1968) Radioisotopes in medicine, US Atomic Energy Commission, Technical information center, Tenesse.
3. Hollander, C.S. and Shenkman, L., (1974) Methods of hormone radioimmunoassay, Academic Press, New York.
4. Hamolsky, M.W., Stein, M. and Freedberg, S. A., (1957) J. Clin. Endocrinol., 17, 33
5. Herbert, V. (1971) U.S. Patent Office #3,442,819
6. Mitchell, M. L., Harden, A. B. and O'Rourke, M.E, (1974) J.Clin. Endocrinol. 20, 1474
7. Rolleri, E., Buzzigoli, G. and Plassio, C., (1982) J. Nucl. Med. 13, 892
8. Nusynowitz, M.L. and Waliszewski, (1971) Am. J. Clin. Pathol.56, 523.
9. Clark, F. and Horn, D.B., (1965) J. Clin. Endocrinol.Metab. 25, 39.
10. Young, D.S., Pestaner, L.C. and Giberman, U. (1975) Clin. Chem. 21, 3660.

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