

کیت رادیوایمونواسی برای تعیین غلظت هورمون تیروکسین

آزاد انسانی

Human Free Thyroxine (FT4) RIA Kit

مقدمه

استفاده روش سنجش ایمونولوژیکی رادیوآکتیو (RIA) امکان تعیین مقدار کمی بسیار از هورمون ها را در مایعات بدن فراهم می آورد. این روش از صحت، حساسیت، تکرارپذیری، سرعت و اختصاصی بودن کافی برخوردار است.

هورمون های تیروکسین (T4) و تری یدوتیرونین (T3) عمدتاً به پروتئین های خاصی در سرم متصل می شوند، که بعنوان حامل این هورمون ها در جریان خون عمل می کنند. دو پروتئین عمده عبارتند از Thyroxine Binding Globulin (TBG) و آلبومین. درصد بسیار کمی از این هورمون ها بصورت آزاد در جریان خون وجود دارند که این قسمت عامل فعالیت های بیولوژیکی این هورمون ها می باشد. مقدار تیروکسین آزاد مستقل از اتصال پروتئینی است، در واقع غلظت FT4 حالت واقعی کارکرد تیروئید را نشان می دهد.

اساس روش اندازه گیری

کیت FT4 موجود بر اساس سنجش ایمونولوژیکی رقابتی تهیه شده است. در این کیت از روش پوشش آنتی ژن استفاده شده است. آنالوگی از T4 که بروی لوله ها پوشش داده شده است با T4 آزاد موجود در نمونه ها برای اتصال به آنتی بادی منوکلونال موشی ضد T4 که با ۱۲۵ نشاندار شده است، رقابت می کند. پس از زمان انکوباسیون، لوله ها تخلیه می شوند. سپس اکتیویته موجود در هر لوله توسط شمارنده گاما اندازه گیری می شود که این اکتیویته بطور معکوس با غلظت T4 آزاد در نمونه ها متناسب است. استانداردهای T4 آزاد با غلظت مشخص، همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که بر اساس منحنی استاندارد مقدار شمارش در مقابل غلظت T4 آزاد، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید.

معرف ها

۱- لوله های پوشش داده شده: شامل ۱۰۰ لوله که با آنتی بادی ضد T4 پوشش داده شده اند.

۲- ردیاب (T4 نشاندار شده با ۱۲۵): یک ویال ۲۴ میلی لیتری آماده مصرف.

۳- استانداردها: ۶ ویال یک میلی لیتری از استاندارد با غلظت های ۰، ۰/۵، ۱، ۵، ۲، ۱۰ براساس ng/dl که در سرم نرمال انسانی تهیه شده و از تیومرسال بعنوان نگهدارنده استفاده شده است.

۴- سرم کنترل: یک ویال آماده مصرف.

۵- محلول شستشو دهنده غلیظ (20X): یک ویال ۲۵ میلی لیتری محلول شستشو که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف لازم است این محلول به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شود.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست

۱- سمپلر ۲۵ و ۲۰۰ میکرولیتری دقیق

۲- آب دیونیزه

۴- شیکر لوله گاما یا روتاتور مناسب

۵- دستگاه شمارنده گاما

۶- کاغذ جاذب رطوبت

۷- لوله های آزمایش معمولی برای شمارش تام

نکلت قابل توجه برای مصرف کنندگان

۱- در این کیت از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر HbsAg و HIV منفی بوده اند.

۲- از استفاده از مواد پس از تاریخ انقضاء خودداری کنید و از مخلوط کردن یا استفاده از کیت ها با شماره بچ مختلف پرهیز نمایید.

۳- درب ظروف را پس از استفاده ببندید و از تعویض درب ها جدا خودداری کنید.

۴- از لباس و دستکش یکبار مصرف هنگام کار با مواد رادیوآکتیو استفاده کنید.

۵- لوازم آزمایشگاهی آلوده به مواد رادیوآکتیو جداگانه و با روش های ایمن (براساس دستورالعمل های حفاظت در برابر اشعه) شستشو و یا پسماند نماید.

تهیه و جمع آوری نمونه

۱- آزمایش را باید بر روی نمونه های سرمی انجام داد. نمونه های شدیداً همولیزه و دارای چربی باید حذف شوند.

۲- نمونه ها را می توان برای دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد و برای زمان های طولانی تر (تا سی روز) در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمود.

۳- از انجماد و ذوب مکرر نمونه ها باید خودداری کرد.

۴- معرف ها باید مستقیماً به لوله ریخته شوند.

۵- از تماس نوک سمپلر با ته لوله خودداری کنید.

آماده سازی معرف ها

۱- کلیه معرف ها را به دمای اتاق برسانید. قبل از استفاده آنها را به آرامی تکان دهید (سر و ته ننمائید).

روش انجام آزمایش

۱- تعداد لوله های کوت شده برای استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید. برای شمارش تام از لوله های معمولی استفاده کنید.

۲- ۲۵ میکرولیتر از استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار را به داخل هر لوله بریزید.

۳- ۲۰۰ میکرولیتر از ردیاب را به تمام لوله ها اضافه کنید.

آزمایشات مکرر به روش رادیوایمونواسی بدست آمده است به قرار زیر می باشد:

محدوده طبیعی 0.80– 2.0 ng/dl

برای تبدیل به واحد SI به شرح ذیل می توان عمل کرد:
 $\text{ng/dl} \times 12.9 = \text{pmol/L}$

خصوصیات کیت

۱- حساسیت

با رقیق سازی متوالی استاندارد ۰/۵ با سرم صفر، حساسیت این کیت برای تعیین مقدار هورمون FT4 برابر ۰/۲ ng/dl بدست آمد.

۲- دقت

برای محاسبه میزان دقت در یک روز و روزهای مختلف، آزمایش بر روی ۳ نمونه سرم ۲۰ بار تکرار شد که ضریب تغییرات به شرح ذیل است.

ضریب تغییرات در روز

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/dl)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
1	20	0.9	0.068	7.5
2	20	1.4	0.085	6.1
3	20	2.8	0.13	4.7

ضریب تغییرات در روزهای مختلف

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/dl)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
1	10	0.71	0.05	7.1
2	10	1.3	0.083	6.4
3	10	2.9	0.16	5.4

۳- ویژگی

از مواد زیر برای بررسی میزان تداخل این کیت استفاده شد.

نوع ماده	غلظت (ng/dl)	درصد تداخل
لووتیروکسین		100
لیوتیرونین	2.5	0.33
دی یدوتیرونین	1.4	0.24
سدیم سالی سیلات	10	0.34

۴- خطی بودن

سه نمونه مختلف سرمی با استاندارد صفر به نسبت های ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۸ رقیق شدند. سپس غلظت FT4 در آنها با استفاده از کیت محاسبه شد که نتایج ذیل بدست آمد.

نمونه سرمی	غلظت اولیه (ng/dl)	درصد بازیابی		
1	1.2	1:2	1:4	1:8
2	1.8	106	108	108
3	3.2	104	105	103

- ۴- لوله ها را بمدت ۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات آنها خوب مخلوط شوند. سپس لوله ها را بمدت یک ساعت در همزن گردان مخصوص شرکت پادتن گستر ایثار یا در شیکر افقی (با دور 280rpm) و در درجه حرارت اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتیگراد) انکوبه کنید.
- ۵- محتویات لوله ها را از طریق مکش یا وارونه کردن تخلیه نمائید (بجز لوله های شمارش تام). سپس لوله ها را دو بار و هر بار با دو میلی لیتر محلول شستشوی آماده مصرف شستشو دهید. برای اطمینان از تخلیه کامل، با وارونه نگهداشتن لوله ها برروی کاغذ جاذب و با ضربت ملایم برروی لوله تمامی مایع موجود در لوله ها را تخلیه کنید.
- ۶- با استفاده از گاما کانتر، اکتیویته موجود در لوله ها بمدت یک دقیقه شمارش کنید.

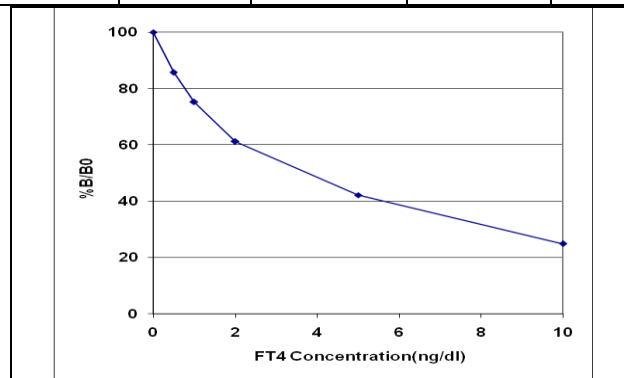
محاسبه نتایج

- ۱- با استفاده از میانگین شمارش استانداردها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد رسم کنید.
- ۲- میانگین شمارش 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.
- ۳- با استفاده از کامپیوتر این محاسبات ساده خواهد شد.

راهنمای محاسبه

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

ردیف	مقدار استاندارد برحسب pmol/L	مقدار استاندارد برحسب ng/dl	شمارش (n=3)	B/B0(%)
0	-----	شمارش تام	223647	----
1	0	0	114522	100
2	6.45	0.5	98124	85
3	12.9	1	86124	75
4	25.8	2	70110	61
5	64.5	5	48222	42
6	129	10	28481	25



مقادیر طبیعی

بدلیل اختلافات سنی، نژادی و رژیم تغذیه، نمی توان برای تمام جمعیت ها محدوده مرجع تعیین کرد. بنابراین هر آزمایشگاه باید محدوده مرجع خود را گزارش نماید. مقادیر طبیعی در سرم افراد نرمال که توسط