

کیت رادیوایمونواسی برای تعیین غلظت تام هورمون

تیروکسین انسانی

Human Total Thyroxine (T4) RIA Kit

مقدمه

استفاده روش سنجش ایمنولوژیکی 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. این روش سنجش ایمنولوژیکی امکان اندازه گیری غلظت بسیار کم هورمون تیروئیدی تری یدوتیرونین (T4) در حجم کمی از سرم (۲۵ میکرولیتر در هر اندازه گیری) برآورده می سازد.

هورمون های تیروکسین (T4) و تری یدوتیرونین (T3) از غده تیروئید ترشح می شوند و از طریق یک سیستم فیدبک حساس بین هیپوتالاموس و هیپوفیز تنظیم می شوند. هیپوتالاموس با آزادسازی هورمون آزاد کننده تیروتروپین (TRH) باعث تحریک غده هیپوفیز برای ترشح هورمون محرک تیروئید (TSH) می شود. اثر این هورمون باعث می شود تا غده تیروئید T4 و T3 را آزاد نماید. این هورمون ها به نوبه خود باعث تنظیم آزادسازی TRH و TSH از طریق مکانیسم کنترلی فیدبک می شوند. در موقع لزوم، این هورمون ها بدخل جریان خون آزاد می شوند. این هورمون ها 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. هر گونه اختلال در غدد تیروئید، هیپوفیز و هیپوتالاموس ممکن است غلظت این هورمون ها را در جریان خون تغییر دهد.

اساس روش اندازه گیری

کیت رادیوایمونواسی T4 موجود بر اساس سنجش ایمنولوژیکی رادیوآکتیو رقابتی تهیه شده است. T4 موجود در نمونه ها برای اتصال به آنتی بادی پلی کلونال خرگوشی ضد T4 پوشش داده شده (coated) بر روی لوله ها با T4 نشاندار شده با ید-۱۲۵ 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 در نمونه ها متناسب است. استانداردهای T4 با غلظت مشخص، همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که بر اساس منحنی استاندارد مقدار شمارش در مقابل غلظت T4، 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 ید-۱۲۵): یک ویال ۲۴ میلی لیتری آماده مصرف.
- ۳- استانداردها: ۶ ویال یک میلی لیتری از استاندارد با غلظت های ۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۵۰ ng/ml 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- سمپلهای ۲۵ و ۲۰۰ میکرولیتری دقیق
- ۲- آب دیونیزه
- ۳- دستگاه گاما کانتر
- ۴- کاغذ جاذب رطوبت
- ۵- 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 بیج مختلف پرهیز نمائید.
- 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 اسفاده آنها را به آرامی تکان دهید (سر و ته نمائید).

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.
- 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 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 بر روی کاغذ جاذب و با ضربت ملایم بر روی 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.

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
1	10	49.5	3.0	6.1
2	10	70.2	3.8	5.4
3	10	161.2	7.9	4.9

۳- ویژگی

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

نوع ماده	غلظت (ng/ml)	درصد تداخل
لووتیروکسین		100
لیوتیرونین	10	0.53
دی یدوتیرونین	150	0.22
سدیم سالی سیلات	1000	0.29

۴- خطی بودن

سه نمونه مختلف سرمی با استاندارد صفر به نسبت های ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۸ رقیق شدند. سپس غلظت T4 در آنها با استفاده از کیت محاسبه شد که نتایج ذیل بدست آمد.

نمونه سرمی	غلظت اولیه	درصد بازیابی		
		1:2	1:4	1:8
1	92.5	105	96.9	97.5
2	143.7	103	98.6	94.2
3	220	97.5	96.5	95.6

منابع

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.

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

محدوده طبیعی 45- 125 ng/ml

برای تبدیل واحدها به شرح ذیل می توان عمل کرد:

$$\text{ng/ml} \times 0.1 = \mu\text{g/dl}$$

$$\text{ng/ml} \times 100 = \text{ng/dl}$$

$$\text{ng/ml} \times 1.289 = \text{nmol/L}$$

$$\text{nmol/L} \times 0.776 = \text{ng/ml}$$

خصوصیات کیت

۱- حساسیت

با رقیق سازی متوالی استاندارد ۲۰ با سرم صفر، حساسیت این کیت برای تعیین مقدار هورمون T4 برابر ۱۰ ng/ml 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/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
1	20	40.2	2.2	5.4
2	20	87.9	3.3	3.8
3	20	235	7.3	3.1