

# MONOKIT

کیت اندازه‌گیری هورمون **Free T4** در سرم انسان  
**Free T4 ELISA Kit 96t**  
Cat. No: 3134-96/ Rev: A3 (1402/09/25)

## مقدمه:

تیروکسین، هورمون اصلی غده تیروئید است که بخش اعظم آن توسط پروتئین‌های حامل در خون جریان دارد. تیروکسین آزاد (FT4) که به پروتئین حامل متصل نیست، مسئول اصلی اعمال بیولوژیکی این هورمون است. اندازه‌گیری سطح سرمی FT4 به منظور بررسی عملکرد تیروئید و بیماری‌های مرتبط با آن اهمیت دارد. در شرایطی نظیر بارداری، استفاده از قرص‌های ضد بارداری و استروژن درمانی غلظت پروتئین‌های حامل تیروکسین تغییر می‌کند که با تغییرات کاذب تیروکسین تام (tT4) همراه خواهد بود؛ درحالی‌که غلظت FT4 به‌صورت ثابت و نرمال باقی می‌ماند. حیطة کاربرد این کیت، اندازه‌گیری کمی غلظت تیروکسین آزاد در سرم انسان به روش الایزا است.

## اصول آزمایش:

این تست بر اساس الایزای رقابتی طراحی گردیده و آنتی‌بادی ضد FT4 در کف چاهک‌ها تثبیت شده است. نمونه‌های حاوی FT4 به‌همراه FT4 کونژوگه شده با آنزیم HRP در چاهک‌ها ریخته می‌شوند و دو آنتی‌ژن با یکدیگر برای واکنش با آنتی‌بادی رقابت می‌کنند. پس از شستشوی چاهک‌ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. شدت جذب نوری هر چاهک با غلظت FT4 موجود در آن رابطه معکوس دارد. درنهایت غلظت FT4 در نمونه‌ها توسط منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

## محتویات کیت:

۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی آنتی‌بادی تثبیت شده.  
۲) کالیبراتور (FT4 Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های نوشته شده بر روی لیبل ویال آن‌ها.

۳) کونژوگه آنزیمی (FT4 Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری.

۴) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.

۵) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.

۶) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.

۷) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.

۸) محلول کنترل (FT4 Control): ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری.

۹) برچسب مخصوص پلیت: یک ورق.

توجه ۱: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.

غلظت کالیبراتورها در هر سری تولید، ممکن است متفاوت باشد و مطابق با مقادیر نوشته شده بر روی لیبل ویال‌ها و گواهی آنالیز محصول (COA) می‌باشد.

توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در برگه COA درج شده است.

## مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

۱) دستگاه خوانش گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).

۲) سمپلر کالیبره.

۳) آب مقطر دیونیزه.

## احتیاط در استفاده از کیت:

۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.

۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نشود.

۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.

۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBS Ag، HIV1/2 و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد

منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شود.

۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری نمایید.

۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

## جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

۱) برای این آزمایش از نمونه‌های سرم استفاده کنید. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا گردد. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نشود.

۲) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا یک ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری نمایید.

## آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:

۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری نمایید.

۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

## روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت نمایید.

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک‌ها را به‌همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های سرم، کالیبراتورها و کنترل در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به‌آرامی به‌مدت ۳۰ ثانیه بر روی میز تکان دهید.

۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت اقدام نمایید.

۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری نمایید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به‌مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۷) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

۸) مقدار جذب را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). در این آزمایش محاسبه غلظت به روش Point to Point و APL (یا Logic-log) قابل اجرا است؛ در صورت استفاده از روش 4PL غلظت کالیبراتور A را عددی کوچک (به عنوان مثال 0.01 ng/dL) در نظر بگیرید.

علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

<b>EC REP</b>	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
<b>LOT</b>	Batch code
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device
<b>CE</b>	European conformity
<b>OBL</b>	Own brand Labeling
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

1. McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
2. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
3. Tietz. Reference information for the clinical laboratory. Hn Textbook of clinical chemistry. Burtis, CA, Ashwood, RA, WB, Saunders. Philadelphia; 1999.

در صورت بروز هرگونه مشکل، خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

۶) بررسی ویژگی-آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)

ویژگی این آزمایش با اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مندرج در جدول زیر به نمونه سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین دوز ماده اضافه شده به دوز FT4 مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب ارزیابی شد. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده  $10 \pm 10\%$  درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Analyte	Cross Reactivity	Concentration
L-Thyroxin	1	
D-Thyroxin	0.9800	10 µg/dl
D-Triiodothyronine	0.0150	100 µg/dl
L-Triiodothyronine	0.0300	100 µg/dl
Iodotyrosine	0.0001	100 µg/ml
Diiodotyrosine	0.0001	100 µg/ml
Diiodothyronine	0.0001	100 µg/ml

۷) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین دور (Between Run)

دقت بین دور با ارزیابی تجدید پذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش  $CV < 10\%$  است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean fT4 (ng/dL)	0.92	3.87	6.05
SD (ng/dL)	0.05	0.20	0.31
CV (%)	5.4	5.2	5.1

۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و به عنوان یک نمونه غلظت FT4 در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش  $Bias < 10\%$  نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (ng/dL)	Added (ng/dL)	Exp. (ng/dL)	Obs. (ng/dL)	% Rec.
1	0.72	5.34	3.03	2.92	96.4
2	4.81	1.43	3.12	3.33	106.7
3	2.62	6.70	4.66	4.71	101.1

۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست، غلظت FT4 در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش  $Bias < 10\%$  است.

No.	Sample (ng/dL)	% Bias			
		1/2	1/4	1/8	1/16
1	5.67	-1.4	-1.9	-2.2	-3.5
2	5.99	1.1	-2.1	-2.3	-3.0
3	6.41	-0.7	1.6	-1.6	-2.3

۵) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با  $0.22 \text{ ng/dL}$  تعیین گردید.

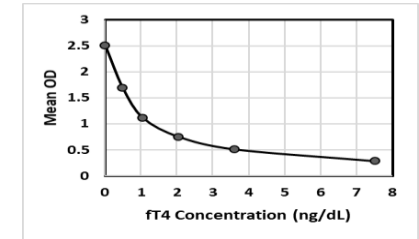
$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

$$LOB = Mean_b + 1.645 SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (ng/dL)
Cal. A	A1	2.450	2.510	0
	B1	2.570		
Cal. B	C1	1.580	1.690	0.49
	D1	1.800		
Cal. C	E1	1.040	1.114	1.05
	F1	1.188		
Cal. D	G1	0.723	0.750	2.05
	H1	0.777		
Cal. E	A2	0.490	0.510	3.6
	B2	0.530		
Cal. F	C2	0.272	0.284	7.5
	D2	0.296		



مقادیر مورد انتظار برای تست FT4 به روش الایزا

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر برای هر آنالیت باید توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

Normal Range (ng/dL)	
Adult	0.8 – 2.0
Pregnancy	0.76 – 2.24

پارامترهای کنترل کیفی

۱) بررسی دقت-آزمون دقت درون دور (Within Run)

دقت درون دور با ارزیابی تکرار پذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش  $CV < 10\%$  است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean fT4 (ng/dL)	0.72	5.30	7.81
SD (ng/dL)	0.04	0.22	0.35
CV (%)	5.5	4.1	4.5