



کیت سنجش ۹۶ تستی T4 Free به روش الایزا
Brochure Rev: A0 (1401/06/08)
REF 3144-96

اهمیت بالینی

تیروکسین (T4) هورمون اصلی غده تیروئید است که تقریباً به طور کامل به پروتئین‌های حامل در خون متصل است و تنها ۰/۳ درصد آن آزاد می‌باشد تا تأثیر خود را روی سلول‌ها اعمال کند. تیروکسین آزاد (ft4) نمایانگر بخش فعال فیزیولوژیکی این هورمون است؛ به همین دلیل اندازه‌گیری غلظت ft4 به عنوان شاخص وضعیت تیروئید بیمار در نظر گرفته می‌شود. کم‌کاری تیروئید اولیه منجر به کمبود T4 تولید شده توسط غده تیروئید و در نتیجه کاهش غلظت ft4 در گردش در خون می‌شود. پرکاری تیروئید اولیه منجر به تولید بیش از حد T4 و در نتیجه افزایش غلظت ft4 می‌شود. 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 در کف چاهک‌ها آنتی‌بادی ضد ft4 تثبیت شده است. ft4 نشان‌دار شده با آنزیم HRP به همراه نمونه‌های سرم حاوی ft4 به چاهک‌ها اضافه می‌شوند در این فرایند رقابت بین ft4 موجود در نمونه و ft4 کوئزوگه برای اتصال به آنتی‌بادی‌های تثبیت شده در کف چاهک صورت می‌گیرد. پس از شستشوی چاهک‌ها، با اضافه کردن محلول سوبسترای آنزیم HRP رنگ آبی تشکیل شده که با افزودن محلول متوقف‌کننده تبدیل به رنگ زرد می‌گردد. محصول نهایی تولید شده 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. در نهایت غلظت ft4 در نمونه‌ها توسط منحنی استاندارد (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت

۱) کالیبراتورها (Calibrators) ۰/۷۵ میلی‌لیتر:

شامل ۶ ویال کالیبراتور با غلظت‌های ۰، ۰/۴۹، ۱/۰۵، ۲/۰۵، ۳/۶، ۷/۵ ng/dL.

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

۲) محلول کوئزوگه آنزیمی (ft4 Enzyme Conjugate) ۱۱ میلی‌لیتر:

یک ویال شامل محلول ft4 نشاندار شده با آنزیم HRP.

۳) پلیت ۹۶ تستی:

یک پلیت تثبیت شده حاوی آنتی‌بادی ضد ft4 که به همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی بسته بندی شده است.

۴) محلول شستشو غلیظ (Wash Buffer-50X) ۲۰ میلی‌لیتر:

یک ویال شامل سورفاکتانت محلول شده در بافر فسفات.

۵) محلول سوبسترای A (Substrate A) ۶/۵ میلی‌لیتر:

یک ویال محلول تترا متیل بنزیدین (TMB).

۶) محلول سوبسترای B (Substrate B) ۶/۵ میلی‌لیتر:

یک ویال محلول هیدروژن پراکساید (H2O2).

۷) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution) ۱۲ میلی‌لیتر:

یک ویال حاوی محلول متوقف‌کننده واکنش.

۸) سرم کنترل (ft4 Control):

ویال(های) حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر سرم کنترل.

۹) برچسب مخصوص پلیت:

یک ورق.

توجه ۱: کلیه اجزای کیت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد

نگهداری شود. محلول متوقف‌کننده را می‌توان در دمای اتاق نگهداری کرد.

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.

موارد احتیاط در استفاده از کیت

• این کیت برای انجام تست‌های تشخیصی در محیط‌های آزمایشگاهی کاربرد دارد. محتویات کیت منشا سرم انسانی داشته و

از نظر عدم وجود HBsAg و آنتی‌بادی‌های ضد HIV1/2 و HCV کنترل شده‌اند، اما از آنجا که هیچ روشی به‌طور صددرصد نمی‌تواند منفی بودن این موارد را تأیید نماید، بنابراین لازم است هنگام استفاده از کیت، مراقبت‌های لازم به عمل آورده شود.

• محتویات تعبیه شده در این کیت برای استفاده در همین سری ساخت بوده و از استفاده مشترک با سایر سری‌ساخت‌ها خودداری فرمایید.

• برای دریافت نتایج بهتر و دقیق‌تر فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ چاهک‌ها رعایت شود. این فاصله زمانی نباید به گونه ای باشد که منجر به اثر دریفت (drift) گردد. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل این نکته حائز اهمیت است. دقت نمایید محلول‌ها نزدیک به ته چاهک ریخته شوند.

• شستشوی نامناسب می‌تواند باعث بوجود آمدن نتایج اشتباه در آزمایش شود.

• کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از استفاده از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است خودداری نمایید.

جمع آوری و تهیه نمونه ها

• نمونه مورد استفاده در این آزمایش سرم انسانی می‌باشد که از خون سیاهرگی تهیه شده و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا می‌گردد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.

• نگهداری سرم باید در لوله‌های در بسته انجام شود. 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 کنید.

آماده‌سازی محلول‌ها

محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از ویال محلول شستشو (50X) را با ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید. محلول آماده شده را 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 کنید.

محلول سوبسترا: محلول‌های سوبسترا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر

محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول سوبسترا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول سوبسترا B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول سوبسترا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

مراحل انجام تست

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

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را جدا نموده و چاهک‌های باقی مانده به همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده، درب آن را ببندید و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌های سرم و یا کنترل را در داخل چاهک‌های مورد نظر بریزید. پیشنهاد می‌شود که از هر نمونه، کنترل یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود و از میانگین جذب نوری آنها استفاده نمایید.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کوئزوگه آنزیمی به تمامی چاهک‌ها اضافه نمایید. پلیت را ۳۰-۲۰ ثانیه به آرامی 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 در روش دستی با وارونه کردن پلیت و در روش دستگاهی با آسپیره کردن کاملاً تخلیه نمایید.

۶) چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده‌سازی محلول‌ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا آماده شده (بخش آماده‌سازی محلول‌ها را مطالعه فرمایید) به چاهک‌ها اضافه نمایید و با برچسب پلیت ببوشانید. چاهک‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری فرمایید.

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

۸) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به چاهک‌ها اضافه نموده و به‌مدت ۲۰-۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید.

در صورت بروز هرگونه مشکل با بخش پشتیبانی شرکت
تینا پژوهان آروین تماس حاصل فرمایید.



Analyte	Cross Reactivity	Concentration
L-Thyroxine	1	
D-Thyroxine	0.9800	10 µg/dL
D-Thyriodothyronine	0.0150	100 µg/dL
L-Thyriodothyronine	0.0300	100 µg/dL
Iodothyrosine	0.0001	100 µg/mL
Diiodothyrosine	0.0001	100 µg/mL
Diiodothyronine	0.0001	100 µg/mL

Sensitivity

بر اساس جمع میانگین جذب کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف
معیار حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت ۰/۳۲ ng/dL می-
باشد.

منابع

1. Barker SB, "Determination of Protein Bound Iodine, Journal Biological Chemistry, 173,175 (1948).
2. Chopra I J, Solomon DH, and Ho RS, "A Radioimmunoassay of Thyroxine", J Clinical Endocrinol, 33, 865 (1971).
3. Young DS, Pestaner L, and Gilberman U, "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", Clinical Chemistry, 21, 3660 (1975).
4. Sterling L, "Diagnosis and Treatment of Thyroid Disease", CRC Press, 19-51 (1975).
5. Halpern EP and Borden RW, "Microencapsulated antibodies in radioimmunoassay: Determination of free Thyroxine" Clinical Chemistry, 25, 1561-1563 (1979).
6. Stjernholm MR, Alsever RN and Rudolph MC, "Thyroid function tests in diphenylhydantoin-treated patients", Clin Chem, 21, 1388 (1977).
7. Nelson J.C. and Wilcox, RB. "Analytical performance of Free and Total thyroxine assays". Clin. Chem. Vol. 42, 146-154 (1996).
8. Midgeley John, "Direct and Indirect Free Thyroxine Assay Methods in Theory and Practice", Clin Chem, 47, 1353-1363 (2001).
9. Bayer MF and McDougall IR, "Radioimmunoassay of free thyroxine in serum: comparison with clinical findings and results of conventional thyroid-function tests", Clin Chem, 26, 1186-1192 (1980).
10. Anthony GW, Jackson RA et al, "Misleading results from immunoassays of serum free thyroxine in the presence of rheumatoid factor", Clin Chem, 43, 957-962 (1997).
11. Wosilait WD, "A theoretical analysis of the distribution of thyroxine among sites on the thyroxine binding globulin, thyroid binding prealbumin and serum albumin", Res Comm Chem Pathology-Pharmacology, 16, 541-548(1977).

پارامترهای کنترل کیفی

Intra – Assay

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه
سرمی با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری بررسی گردید.
معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean fT4 (ng/dL)	0.79	3.1	6.9
SD (ng/dL)	0.04	0.14	0.27
C.V (%)	5.1	4.5	3.9

Inter – Assay

دقت بین‌تستی با ارزیابی نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با
غلظت‌های متفاوت در چهار نوبت کاری (هر نوبت پنج بار تکرار)
بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean fT4 (ng/dL)	1.2	3.9	7.1
SD (ng/dL)	0.07	0.21	0.31
C.V (%)	5.8	5.3	4.3

Recovery

در این تست دو نمونه سرم به‌نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب
شده و به‌عنوان یک نمونه، مقدار fT4 در آن اندازه‌گیری شد.
معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 10\%$ است.

No.	Sample (ng/dL)	Added (ng/dL)	Exp. (ng/dL)	Obs. (ng/dL)	% Rec
1	6.31	1.96	4.1	4.24	103.4
2	3.32	7.18	5.25	5.09	96.9
3	1.13	3.67	2.4	2.34	97.5

Linearity

در این تست، غلظت fT4 در رقت‌ها مختلف نمونه سرم برای
تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این
آزمایش $Bias < 10\%$ است.

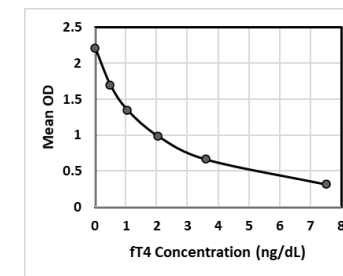
No.	Sample (ng/dL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	5.98	1.2	-2.3	-1.7	2.8
2	6.1	2.5	1.4	-1.6	-3.1
3	5.7	-3.4	-2.4	-2.9	1.6

Cross Reactivity

اختصاصیت این آزمایش با اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از
مواد مداخله‌گر به سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع
با اندازه‌گیری نسبت بین دوز ماده مداخله‌گر به دوز fT4 مورد
نیاز برای همان مقدار جذب ارزیابی شد.

(۹) شدت جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر
حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید. از
طول موج رفرنس ۶۳۰-۶۲۰ نانومتر استفاده کنید. در این آزمایش
محاسبه غلظت به روش Point to Point قابل اجرا است؛ اما روش
4PL (یا Logic-log) ارجحیت دارد. میزان جذب و نمودار
کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrators Number	Well Number	Abs	Mean Abs	Conc. (ng/dl)
Cal. A	A1	2.201	2.215	0
	B1	2.230		
Cal. B	C1	1.694	1.702	0.49
	D1	1.711		
Cal. C	E1	1.340	1.350	1.05
	F1	1.361		
Cal. D	G1	0.981	0.986	2.05
	H1	0.992		
Cal. E	A2	0.671	0.664	3.6
	B2	0.657		
Cal. F	C2	0.311	0.317	7.5
	D2	0.323		



توجه: جذب نوری به‌دست آمده از کالیبراتورها و همچنین منحنی
فوق فقط به‌عنوان مثال ذکر شده و در هر آزمایشگاهی در هر مرتبه
آزمایش باید منحنی جدیدی ترسیم گردد.

مقادیر مورد انتظار

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

Normal Range	
Adult	0.8 – 2 ng/dL
Pregnancy	0.76 – 2.24 ng/dL