www.padyabteb.com

Free T4

Thyroid ELISA Kits

REF: PT-EFT4-105

IVD

مقدمه

تیروکسین، هورمون اصلی غده تیروئید می‌باشد. با توجه به حلالیت کم این هورمون در محیط آبی، بخش عمده تیروکسین (بیش از ۹۹/۵ %) به پروتئین حامل مانند گلوبولین تیروکسین، آلبومین و پره آلبومین متصل بوده، بخش کمی به صورت آزاد در خون وجود دارد. از آنجایی که بخش آزاد واجد فعالیت فیزیولوژیک است، اندازه گیری آن معیار مناسب‌تری نسبت به تیروکسین تام در اختیار می‌گذارد چرا که مقدار تیروکسین تام تحت تاثیر میزان پروتئین‌های حامل قرار می‌گیرد اما بخش آزاد تقریباً بدون تغییر باقی می‌ماند. با این وجود غلظت و ساختار این پروتئین‌های حامل در نارسایی یا اختلالات عملکرد کلیه و کبد و همچنین دوران بارداری ممکن است دستخوش تغییرات گردد. این امر می‌تواند باعث افزایش یا کاهش کاذب در مقادیر Total T4 گردد. بنابراین اندازه گیری غلظت Free T4 در تشخیص بیماری‌های تیروئید عامل مهمی محسوب می‌شود، در واقع غلظت FreeT4، حالت واقعی کارکرد تیروئید را نشان می‌دهد و سنجش این میزان از T4 آزاد از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد.

اساس روش اندازه‌گیری

این تست به کمک آنتی بادی مونوکلونال اختصاصی به روش رقابتی طراحی شده است. بدین صورت که تیروکسین آزاد موجود در استاندارد و نمونه‌های مورد سنجش جهت اتصال به آنتی بادی تثبیت شده در چاهک‌ها با تیروکسین متصل به آنزیم رقابت می‌کند. چاهک‌ها توسط آنتی بادی مونوکلونال که علیه مولکول T4 می‌باشد پوشش داده می‌شوند. استانداردها و نمونه بیماران با آنتی‌بادی پوشش داده شده در ته چاهک‌ها مجاور شده و سپس محلول T4 کونژوگه با آنزیم (HRP) به چاهک‌ها اضافه می‌شوند که این T4 کونژوگه با T4 آزاد نمونه‌ها در اتصال به آنتی‌بادی‌های کوت شده در چاهک‌ها رقابت می‌کند. هر چه مقدار FT4 درنمونه بیشتر باشد مقدار T4 کونژوگه کمتری به آنتی‌بادی‌های کوت شده متصل می‌شود و بالعکس.

پس از گذشت زمان انکوباسیون (۴۵ دقیقه) در دمای اتاق و شستشو چاهک‌ها توسط محلول شستشو دهنده و اضافه کردن محلول سوبسترا و محلول رنگزا و انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه رنگ آبی ظاهر می‌گردد. با اضافه کردن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می شود. شدت رنگ در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری می‌گردد.

با افزودن کروموژن واکنش آنزیمی متناسب با کمپلکس‌های آنزیمی انجام می شود که با میزان تیروکسن نمونه رابطه عکس دارد.

بنابراین شدت رنگ رابطه معکوس با غلظت FT4 در نمونه دارد.

محتویات کیت

ردیف	نام محصول	حجم/ تعداد
1	پلیت پوشانده شده با آنتی بادی مونوکلونال Anti-T4 (Anti-T4 Coated plate)	1X96 test
2	محلول آنزیم کونژوگه آماده مصرف (Enzyme Conjugate)	1X12 ml
3	استاندارد در غلظت 0.0 ng/dl (Cal F.T4 0.0 ng/dl)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 0.5 ng/dl (Cal F.T4 0.5 ng/dl)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 1 ng/dl (Cal F.T4 1 ng/dl)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 2.5 ng/dl (Cal F.T4 2.5 ng/dl)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 5 ng/dl (Cal F.T4 5 ng/dl)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 10 ng/dl (Cal F.T4 10 ng/dl)	1X0.5 ml
4	بافر شستشوی غلیظ 20X (Wash Buffer)	1X30 ml
5	محلول سوبسترا – رنگزا (Chrom Substrte)	1X11ml
6	محلول متوقف کننده (Stop Solution)	1X6 ml
7	سرم کنترل به همراه نگهدارنده (Control serum)	1X0.5 ml
8	برچسب مخصوص پلیت	۱ عدد

+ محلول شستشو، رنگزا و متوقف کننده در همه کیت‌ها مشترک می‌باشند.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند

1- سمپلرهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری

2- آب مقطر

3- دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری به عنوان فیلتر رفرانس

4- کاغذ جاذب رطوبت

نگهداری کیت

1- کیت در یخچال در دمای ۸-۲ °c نگهداری شود.

2- میکروپلیت‌ها باید در کیسه در بسته به همراه نمگیر نگهداری شود.

3- مدت زمان پایداری کیت تا پایان تاریخ انقضا (یکسال از زمان تولید) نوشته شده برروی برچسب کیت می‌باشد.

4- کیت باز شده حداقل به مدت ۲ ماه در دمای ۸-۲ °c پایدار خواهد بود.

5- محلول شستشوی رقیق شده به نسبت ۱ به ۲۰ به مدت یک هفته در دمای ۸-۲ °c قابل نگهداری و مصرف می‌باشد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه

پس از جداسازی سرم از نمونه خون بیمار، نمونه را می‌توان به مدت ۴۸ ساعت در درمای ۸-۲ °c نگهداری شوند. جهت نگهداری طولانی‌تر، نمونه‌ها باید در دمای ۲۰ °c- نگهداری شوند. نمونه‌های ذوب شده باید قبل از آزمایش مخلوط شوند. بهتر است ترجیحاً از نمونه‌های با کدورت بالا، همولیز و لیپمیک استفاده نشود. در ضمن باید از فریز و ذوب مکرر نمونه‌ها (Freeze-Thaw) اجتناب گردد.

نکات قابل توجه

1- کیت فقط جهت استفاده در آزمایشگاه تشخیصی کاربرد دارد.

2- استفاده از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه جهت دقت و صحت بیشتر.

3- شستشو چاهک‌ها به صورت کامل جهت نتیجه بهتر.

- بررسی چاهک‌ها از نظر وجود حباب.
- خارج کردن حباب از چاهک‌ها با زدن ضربه آهسته به پلیت.

4- عدم ترکیب اجزاء کیت با سری ساخت متفاوت.

5- جلوگیری از تعویض درب معرف‌ها.

6- جلوگیری از تماس معرف به ویژه معرف حاوی اسیدکلریدریک با پوست (در صورت تماس با آب کافی شستشو داده شود).

7- از استعمال دخانیات، خوردن و آشامیدن اجتناب شود.

8- از پی‌پت کردن مواد با دهان پرهیز شود.

9- از دستکش و کلاه مناسب استفاده شود.

+ جهت ساخت برخی از اجزای این کیت از سرم انسانی که از نظر HCV، HbsAg، HIV منفی می‌باشد، استفاده شده است.

آماده سازی معرف‌ها

1- همه معرف‌ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (۲۵-۱۸ درجه سانتی گراد) برسند.

2- تهیه محلول شستشو: برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمائید.

نکته‌های مهم

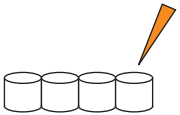
1- توصیه می‌شود که بیشتر از ۳۲ چاهک در هر ران کاری استفاده نشود. اگر پی‌پت به صورت دستی انجام می گیرد، پی‌پت کردن همه استانداردها، نمونه‌ها ، کنترل‌ها باید در ۵ دقیقه تمام شود. برای پی‌پت کردن کل پلیت ۹۶ تستی باید از دستگاه اتوماتیک استفاده شود.

2- فرایند شستشو خیلی مهم است. شستشوی ناکافی باعث کاهش دقت و افزایش کاذب جذب می شود.

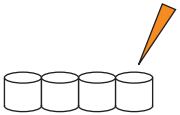
روش انجام آزمایش

1- انتخاب تعدادچاهک‌های کوت شده برای استانداردها، کنترل و نمونه‌های بیمار بصورت دوتایی و قراردادن مابقی چاهک‌ها در کیسه مخصوص به همراه نمگیر و بستن درب آن.

2- ۲۵ µl استانداردها، کنترل و نمونه‌ها به چاهک‌ها اضافه نمایید.



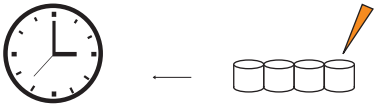
3- ۱۰۰µl آنزیم کونژوگه HRP به تمام چاهک‌ها اضافه نمایید.



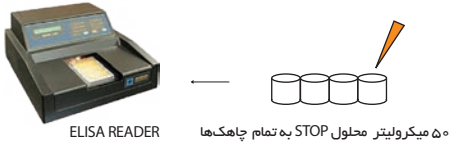
4- پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید و سپس درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.

5- محتویات چاهک‌ها را خالی کنید و چاهک‌هارا ۵ بار با ۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشوی آماده شستشو دهید. سپس چاهک‌ها را وارونه کنید و همراه با تکان دادن خالی کنید و در انتهای شستشو با ضربات ملایم بر روی کاغذ جاذب تمامی مایع موجود در چاهک‌ها را تخلیه نمایید.

6- ۱۰۰µl از سوبسترای آماده مصرف به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید.



7- ۵۰ µl از محلول متوقف کننده به همه چاهک‌ها اضافه کنید. سپس جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت کنید (در صورت امکان از طول موج ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید). سنجش جذب نوری باید حداکثر تا ۱۵ دقیقه پس از انجام آزمایش انجام شود.



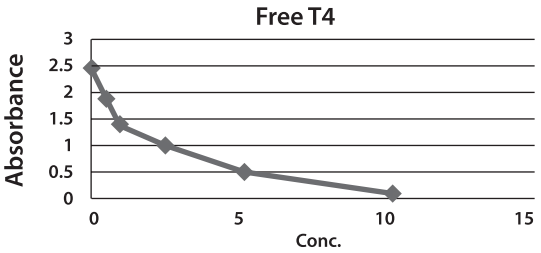
محاسبه نتایج

1- با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) برروی کاغذ میلی‌متری، منحنی استانداردی رسم کنید.

2- میانگین جذب نوری 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.

راهنمای محاسبه

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



ردیف	مقدار استاندارد (ng/dl)	جذب
۱	۰	۲/۴۵
۲	۰/۵	۱/۹
۳	۱	۱/۴۷
۴	۲/۵	۱/۰۲
۵	۵	۰/۵۵
۶	۱۰	۰/۱۵

مقادیر طبیعی

بدلیل اختلافات سنی، نژادی و رژیم تغذیه، نمی‌توان برای تمام جمعیت‌ها 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 الایزا بدست آمده است به قرار زیر می‌باشد:

محدوده طبیعی : ۰/۷ – ۲/۰ ng/dl

خصوصیات کیت

1- حساسیت آنالیتیکال (حد تشخیص) :

برای تعیین حد تشخیص ۲۰ مرتبه استاندارد صفر آزمایش شد. حد تشخیص از ۲ انحراف معیار (SD) بالاتر از میانگین جذب در غلظت صفر بدست آمد. حد تشخیص برای این کیت ۰/۲ ng/dl بدست آمد.

2- دقت:

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

دقت درون سنجی				
نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/dl)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (% CV)
۱	۲۰	۰/۸۶	۰/۰۶	۶/۹
۲	۲۰	۱/۲	۰/۰۷	۶/۲
۳	۲۰	۲/۲	۰/۱۱	۴/۹

دقت میان سنجی				
نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/dl)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (% CV)
۱	۲۰	۱/۱۶	۰/۰۸	۷/۱
۲	۲۰	۱/۵۲	۰/۰۶	۳/۷
۳	۲۰	۳/۲۸	۰/۱۳	۳/۹

3- ویژگی:

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

نوع ماده	غلظت (µg/dl)	درصد تداخل
لووتیروکسین	–	۱۰۰
لیوتیرونین	۲/۵	۰/۳۳
دی یدوتیرونین	۱/۴	۰/۲۴
سدیم سالی سیلات	۱۰	۰/۳۴

4- خطی بودن:

سه نمونه مختلف سرمی با استاندارد صفر به نسبت‌های 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 خطی بودن		
		۱:۲	۱:۴	۱:۸
۱	۲/۲۷	۱۰۹	۱۱۰	۱۰۷
۲	۲/۰۴	۹۸	۱۰۲	۱۰۸
۳	۳/۵۴	۱۰۱	۱۰۵	۱۰۴

+ References

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.

پاره‌ای نکات علمی در خصوص رفع مشـکلات احتمالی در کیت‌های الایزا :

	علت مشکل	راه حل
پایین بودن OD استانداردها و نمونه‌ها	افـت و یـا آلودگـی کونژوگه	تکـرار تسـت بـا کونژوگـه جدید
	پاییـن بـودن دمـا و یـا کوتـاه بـودن زمان انکوباسـیون، بـه دما نرسـیدن محلول‌هـای کیت و نمونه بیماران	• دمای آزمایشـگاه و تایمر را چـک کرده و تسـت را تکرار کنید. • قبل از شروع آزمایش کیت و نمونه بیماران به دمای اتاق برسد.
	PH نامناسب و یا غلظت بـالای Wash Buffer، شستشـوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها	• PH آب مقطـر را چک کنید و تسـت را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. • پـس از شستشـوی کامل و تخلیه چاهک‌هـا بلافاصله تست را ادامه دهید.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایـت زنجیره سرد	• پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه‌کنید. • پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.

	طول موج خوانش نامناسب(۴۰۵ نانومتر بجای ۴۵۰ نانومتر)	• تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. • طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
عدم تولید رنگ در چاهک‌ها	استفاده از مواد سایر کیت‌ها	تکرار تست با مواد همان کیت
	انجام نشدن مرحله‌ای از تست	تکرار تست
	آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید	تکرار تست با محلول کونژوگه جدید
صحیح نبودن نمودار	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید

صحیح نبودن نمودار	پی‌پتینگ نامناسب	• استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف. • از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده‌کنید. • توجه کنید نوک سمپلر محکم به‌سمپلر متصل باشد. • توجه کنید در هنگام پی‌پتینگ حباب وارد نوک سمپلرنشود.
	PH نامناسب و یا غلظت بالای، Wash Buffer	PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید.
	شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها	پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید.

بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD	آلودگی استاندارد صفر	تکرار تست با استانداردهای جدید
	آلودگی محلول رنگزا	استفاده از محلول رنگزا جدید
	آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نا مناسب	• عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. • تمام سوزن‌های دستگاه واشر را چک کنید.
	طول موج نامناسب در خوانش	• تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. • طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. • از فیلتر ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس استفاده‌کنید.

	آلودگی محلول Stop	تکرار تست با محلول Stop جدید
	ایجاد وقفه در خوانش	بلافاصله بعد از Stop کردن تست، یا حداکثر تا ۱۵ دقیقه پلیت را بخوانید.
عدم تکرار پذیری مناسب	پی‌پتینگ نا مناسب	• استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف • از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید. • توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. • توجه کنید در هنگام پی‌پتینگ حباب وارد نشود. • توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد. • کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلرها.

عدم تکرار پذیری مناسب	طولانی شدن زمان انجام تست	فاصله زمانی بین اضافه کردن استانداردها و نمونه نباید بیشتر از ۱۰ دقیقه باشد. در این صورت نتایج قابل اعتماد نیست.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	• پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. • پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.
	باقی ماندن کونژوگه در لبه چاهک‌ها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها.	پی‌پتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	وجود حباب در چاهک‌ها	در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک‌ها نباشد.
	کثیف بودن کف چاهک‌ها	کف چاهک‌ها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید.
	مخلوط نشدن محلول‌های کیت	قبل از استفاده از ویال محلول‌ها را به آرامی تکان دهید.

خلاصه روش آزمایش

معرف‌ها	استانداردها	نمونه‌ها
استانداردها	۲۵µl	–
نمونه‌ها	–	۲۵µl
کونژوگه	۱۰۰µl	۱۰۰µl

در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه نمایید.

۵ بار با ۳۵۰µl محلول بافرشستشو رقیق شستشو دهید و با دقت محتویات را خالی کنید.

محلول رنگزا	۱۰۰µl	۱۰۰µl

به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی انکوبه نمایید.

محلول متوقف‌کننده	۵۰µl	۵۰µl

جـذب نوری هر چاهـک در طول موج ۴۵۰ nm و فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm قرائت شود.

www.padyabteb.com

PADYABTEB
Producer of Diagnostic Products

دفتر فروش و خدمات پس از فروش:

تهران . ۲۴ متری سعادت آباد . خیابان یکم شرقی . خیابان شب بو شرقی . پلاک ۱۷
طبقه دوم . واحد ۸ **تلفن:** ۴۲۰۸۷۳۰۰ (۰۲۱) **خدمات پس از فروش:** ۰۹۱۲۹۴۰۹۱۲۴

کارخانه:

شهرک صنعتی اشتهارد . بلوار ابوریحان بیرونی . بلوار غزالی غربی . خیابان لادن ۲
تلفن: ۸ ـ ۳۷۷۷۵۵۳۱ (۰۲۶) **فکس:** ۳۷۷۷۵۵۲۹ (۰۲۶)

SIQ CERTIFICATION ISO9001:2008 — BRITISH CERTIFICATION — GMP IQC Integrated Quality Control — TCL ISO 13485 — JAS-ANZ

eztest
ELISA Kits