شرکت دانش بنیان
پیشتاز طب
(سهامی خاص)

کیت سنجش Free T4 به روش الایزا

مقدمه :

هورمون تیروکسین (T4) هورمون عمده و مهم تیروئید در خون می باشد و بوسیله پروتئینهای حامل که اصلی ترین آنها TBG می باشد، انتقال می یابد. قسمت عمده T4 در خون متصل به پروتئینها بوده و تنها در حدود ۰/۰۳ درصد آن به شکل آزادمی باشد (Free T4) و در واقع همین شکل آزاد است که دارای فعالیت بیولوژیک بوده و روی سلولهای هدف مؤثر است. مقدار کل تیروکسین در خون (Total T4) بعنوان یک فاکتور مهم در بررسی وضعیت تیروئید مطرح می باشد اما به علت تغییر غلظت پروتئینهای حامل در مواردی مثل بارداری، مصرف قرصهای ضد بارداری، استروژن درمانی و بیماریهای مرتبط با تیروئید مقدار Total T4 نیز بطور کاذب دچار تغییر می گردد و این در حالیست که تیروئید دارای عملکرد طبیعی می باشد. همچنین در بعضی موارد با وجود عملکرد غیر طبیعی تیروئید (هیپو تیروئیدیسم و هیپرتیروئیدیسم) تغییرات بوجود آمده در غلظت TBG می تواند باعث ثبت نتایج نا درست در سنجش مقدار واقعی Total T4 شود. از این روی اندازه گیری غلظت Free T4 که غیر وابسته به عوامل فوق می باشد وضعیت و عملکرد غدهٔ تیروئید را بهتر نمایان می سازد و بعلاوه جایگزین بهتری بجای FTI می باشد .

اساس آزمایش :

کیت Free T4 حاضر به روش رقابتی و به کمک آنتی بادی منوکلونال طراحی گردیده است. در این روش چاهکها توسط آنتی بادی منوکلونال که علیه مولکول T4 می باشد پوشش داده می شوند (Coating). استانداردها و نمونه بیماران با آنتی بادی پوشش داده شده در ته چاهکها مجاور شده و سپس محلول T4 کنژوگه با آنزیم HRP به چاهکها اضافه می شوند که این T4 کنژوگه (T4-HRP) با T4 آزاد نمونه ها در اتصال به آنتی بادیهای کوت شده در چاهکها رقابت می کند، بنابراین هر چه مقدار Free T4 در نمونه بیشتر باشد مقدار T4 کنژوگه کمتری به آنتی بادی های کوت شده متصل می گردد و بالعکس .پس از شستشو، محلول رنگزا که حاوی هیدروژن پراکسید (H2O2) و کروموژن است، داخل چاهکها ریخته شده که بعد از انکوباسیون رنگ آبی پدید آمده به صورت معکوس با غلظت Free T4 موجود در نمونه ها متناسب است. برای جلوگیری از فعالیت بیش از اندازه و نامناسب آنزیم، محلول متوقف کننده افزوده می گردد که فعالیت آنزیم را مختل کرده و رنگ آبی را به زرد تبدیل می نماید و بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد .

محتویات کیت :

۱) پلیت ۹۶ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد T4 (Anti-T4 Coated Plate) .
۲) محلول آنزیم کنژوگه (T4 Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۶ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۳) سری استانداردها (Standards Set) : ۶ ویال استاندارد شامل غلظتهای T4 ng/dl ۰ ، ۰/۲ ، ۰/۸ ، ۲ ، ۴ ، ۸ (استاندارد صفر حاوی ۱ میلی لیتر و سایر استانداردها حاوی ۰/۵میلی لیتر می باشند) .
۴) سرم کنترل : یک ویال حاوی ۱ میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال .
۵) محلول (Assay Buffer) : یک ویال حاوی ۶ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۶) محلول شستشو : یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (20 X) . جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف مقدار لازم از محلول شستشوی غلیظ را به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق کنید .
۷) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر .
۹) برچسب مخصوص پلیت .

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند :

۱) دستگاه الایزاریدر با طول موج ۴۵۰ نانومتر و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر .
۲) سمپلر های ۲۵ و۵۰ و۱۰۰ میکرولیتر دقیق .
۳) آب مقطر .

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

۱) محتویات این کیت برای مصرف در همین کیت طراحی شده است .
۲) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید .
۳) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg و آنتی بادی های ضد HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند، جهت احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش چهارم – اردیبهشت ۹۲

شرایط نگهداری :

۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید .
۲) چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید .
۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضاء نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد .
۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۸ – ۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد .

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم یا پلاسما را می توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود، نمونه را می توان به مدت دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و یا برای مدت زمان طولانی تر (حداکثر تا ۳۰ روز) در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری نمود. در ضمن باید از Freeze-thaw نمودن نمونه پرهیز شود .

توضیحات عمومی :

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق رسانده و بخوبی تکان دهید تا کاملاً یکنواخت شوند .
۲) بهتر است به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند .
۳) از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید .
۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده ، جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .
۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شود .
۶) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب زمان انکوباسیون مناسب می باشد، بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب محلولهای مورد نیاز را باز کنید، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیقتر می شود .
۷) به دلیل مشابه در بند ۶ بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه ها بیش از ۵ دقیقه بطول نیانجامد .

مراحل انجام آزمایش :

۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب نموده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .
۲) ۲۵ میکرولیتر از هر استاندارد، سرم کنترل و نمونه را داخل هر چاهک بریزید ، پیشنهاد می گردد که از استانداردها و نمونه ها بصورت داپلیکیت استفاده شود بدین معنی که هر استاندارد و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید، سپس۵۰ میکرولیتر اسی بافر و در پی آن۵۰ میکرولیتر آنزیم کنژوگه را داخل چاهک ها ریخته و برای مدت ۱۵ ثانیه پلیت را تکان دهید تا محتویات چاهکها خوب مخلوط شوند و آنگاه درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت ۱ ساعت در درجه حرارت اتاق (۲۸– ۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید .
۳) چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید. (برای شستشو می توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد، در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو چاهکها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند) .
۴) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) به هر چاهک اضافه نمایید و چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید
۵) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزاریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نمایید (توصیه میشود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد) .

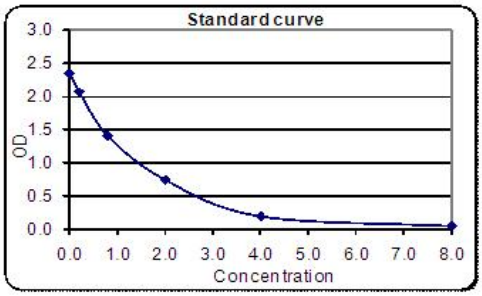
محاسبه نتایج :

از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm میتوان استفاده نمود .
۱) جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید .
۲) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آنها نموداری (Point to point) رسم کنید به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آنها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد بدست آورید، سپس نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی بدست آید .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش چهارم – اردیبهشت ۹۲

۳) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن راپیدا کنید، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید بطوریکه این خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و بعد از محل تلاقی خط و منحنی خط عمودی بر محور افقی وارد کنید، نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد .

جذب نوری	استانداردها (ng/dl)
۲/۲۰	۰
۱/۸۰	۰/۲
۱/۰۰	۰/۸
۰/۳۰	۲
۰/۰۵۵	۴
۰/۰۲۳	۸



توجه : جذبهای نوری و منحنی مربوطه فقط به عنوان نمونه می باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید .

مقادیر مورد انتظار :

مقادیر نرمال Free T4 درسرم افراد طبیعی که توسط تستهای مکرر به روش الایزا بدست آمده به قرار زیر می باشد ولی پیشنهاد می گردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد :

محدوده طبیعی برحسب واحد ng/dl
۰/۷–۱/۸

شاخصهای اجرایی :

۱) حداقل مقدار قابل اندازه گیری :

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت Free T4 قابل تشخیص در این کیت ۰/۱ ng/dl می باشد .

۲) دقت آزمایش :

آزمایشهای اینترا– اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و اینتر– اسی (همخوانی غلظت مشخص ازیک نمونه در سری آزمایش های مختلف) با استفاده از ۳ سرم با غلظتهای مختلف Free T4 انجام گردید که در جداول ۱ و ۲ آمده است :

جدول شماره ۱ (اینترا– اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (ng/dl)	SD	CV (%)
۱	۲۴	۰/۵	۰/۰۳	۶
۲	۲۴	۱/۵	۰/۰۵	۳/۳
۳	۲۴	۷/۴	۰/۲۶	۳/۵

جدول شماره ۲ (اینتر– اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (ng/dl)	SD	CV (%)
۱	۱۰	۰/۵۶	۰/۰۴	۷/۱
۲	۱۰	۱/۵۵	۰/۰۶	۳/۹
۳	۱۰	۷/۶۷	۰/۳۵	۴/۶

هر سری آزمایش بصورت Duplicate انجام شده است .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش چهارم – اردیبهشت ۹۲

۳) ریکاوری آزمایش :

مقادیر معلومی از Free T4 به ۴ سرم با غلظتهای مشخص Free T4 افزوده شد و ریکاوری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول زیر آمده است :

نمونه	مقدار Free T4 موجود در سرم (ng/dl)	مقدار افزوده شده Free T4 (ng/dl)	مقدار مورد انتظار (ng/dl)	مقدار بدست آمده (ng/dl)	ریکاوری (%)
۱	۰/۵۳	۰/۲	۰/۳۶	۰/۳۴	۹۵
۱	۰/۵۳	۰/۸	۰/۶۶	۰/۶۵	۹۸
۱	۰/۵۳	۲	۱/۲۶	۱/۱۵	۹۱
۲	۰/۹۵	۰/۲	۰/۵۷	۰/۶	۱۰۵
۲	۰/۹۵	۰/۸	۰/۸۷	۰/۸	۹۲
۲	۰/۹۵	۲	۱/۴۷	۱/۵	۱۰۲
۳	۱/۵	۰/۲	۰/۸۵	۰/۸۳	۹۸
۳	۱/۵	۰/۸	۱/۱۵	۱/۱۹	۱۰۳
۳	۱/۵	۲	۱/۷۵	۱/۸۶	۱۰۶
۴	۳/۱	۰/۲	۱/۶۵	۱/۶	۹۷
۴	۳/۱	۰/۸	۱/۹۵	۱/۸۱	۹۳
۴	۳/۱	۲	۲/۵۵	۲/۵۸	۱۰۱

٤) خطی بودن آزمایش :

به کمک استاندارد صفر رقتهای متوالی ۳ نمونه سرم با غلظت مشخص از Free T4 تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت محاسبه شد که در جدول زیر نتایج آن آورده شده است :

نمونه	مقدار Free T4 موجود در سرم رقیق نشده (ng/dl)	ریکاوری (%)			
		رقت ۱/۲	رقت ۱/۴	رقت ۱/۸	رقت ۱/۱۶
۱	۷/۸	۱۰۷	۱۰۳	۱۰۲	۹۸
۲	۶/۵	۹۵	۱۰۱	۹۹	۱۰۷
۳	۳/۴	۹۲	۱۰۹	۹۱	۱۰۴

0) اختصاصیت آزمایش:

اختصاصیت این آزمایش به کمک سرمهایی با غلظتهای مختلف 3, 3’, 5 – Triiodothyronine (T3) ، 3, 3’, 5’ – Triiodothyronine (rT3) ، 3, 3’, 5 - Triiodothyro acetic acid – 3, 3’, 5 – Triiodothyropropionic acid و 3, 5 - Diiodothyronine جهت بررسی واکنشهای متقاطع با Free T4 بررسی شد که نتایج آن در جدول زیر آمده است :

آنالیت	غلظت (nmol/L)	غلظت ظاهری (ng/dl) Free T4
3, 5 - Diiodothyronine	۱۰۰۰	<۰/۱
3, 3’, 5 – Triiodothyronine (T3)	۱۰۰	<۰/۱
3, 3’, 5’ - Triiodothyronine (rT3)	۱۰۰	<۰/۱
3, 3’, 5 - Triiodothyro acetic acid	۱۰۰	<۰/۱
3, 3’, 5 – Triiodothyropropionic acid	۱۰۰	<۰/۱

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱٤۹٤۷۳٤٤٦۳
تلفن ٤۲۱۹۷۰۰۰ فکس ٤۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش چهارم – اردیبهشت ۹۲

References:

1-Tiet, N.W, Fundamentals of clinical chemistry, 2nd Ed, Pg, 602 saunders press, phila, 1976
2-Barker,S.B. – Determination of protein bound iodine journal biological chemistry, 173, 175, (1984)
3-young, D.S, pestaner, L.C and Gilberman, U young effects of drugs on clinical laboratory tests clincal chemistry, 21, 3660, (1975)
4-sati, c. , chattor, A.J. , Watts, N. in fundamentals of clinical chemistry. Ed, Tietz, N.W. 3rd Edition, pg. 586, saunders press phila.1987

روش انجام آزمایش بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی بادی ضد Free T4			
محلولها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
استانداردها	۲۵ میکرولیتر	–	–
سرم کنترل	–	۲۵ میکرولیتر	–
نمونه	–	–	۲۵ میکرولیتر
اسی بافر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر
آنزیم کنژوگه	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر
پلیت را به ملایمت برای مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهکها بخوبی مخلوط شوند سپس دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید . طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید .			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر(و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس)قرائت کنید .			

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com

ویرایش چهارم – اردیبهشت ۹۲