معرف	48 تستی	96 تستی	آماده سازی
پلیت پوشیده شده با آنتی بادی علیه T4	1×48 wells	1×96 wells	آماده مصرف
کالیبراتور 1-6 (0، 0.5، 1.0، 2.5، 5، و 10 نانوگرم در دسی لیتر) در بافر، به همراه نگهدارنده	6 ×0.5 mL	6 ×0.5 mL	آماده مصرف
نمونهٔ کنترل در بافر سازگار با سرم انسانی همراه با نگهدارنده(بازه قابل قبول سرم کنترل برروی برچسب قید شده است)	1 ×0.5 mL	1 ×0.5 mL	آماده مصرف
کونژوگه T4-HRP(قرمز رنگ)	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول شستشو غلیظ	1 ×30 mL	1 ×30 mL	به نسبت 1 به 20 با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید
محلول سوبسترا-رنگ زا(تترامتیل بنزدین و آب اکسیژنه)	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول توقف (اسید کلریدریک 1 مولار)	1 ×6.0 mL	1 ×6.0 mL	آماده مصرف

کاربرد:

کیت FT4 ELISA Kit شرکت پیشگامان سنجش برای اندازه گیری کمی هورمون تیروکسین آزاد یا Free T4 در سرم یا پلاسما طراحی گردیده است.

مقدمه :

دو هورمون تیروکسین (T_4) و تری یدو تیرونین(T_3) توسط غده تیروئید تولید و وارد خون می شوند. فقط ٪20 هورمون T_3 مستقیماً توسط تیروئید ساخته می شود و ٪80 آن توسط آنزیم 5′-یدیناز در نسوج از برداشتن یک اتم ید از تیروکسین ساخته می شود. از آنجایی که نیمه عمر T_3 در مقایسه با T_4 کمتر است (2 روز در مقایسه با 7 روز) لذا به نظر می رسد تیروکسین عمدتاً به عنوان منبع ذخیره و پیش ساز هورمون T_3 که فعال ترین فرم بیولوژیک هورمون های تیروئیدی است، عمل می کند. قسمت اعظم T_4 و T_3 موجود در خون به صورت متصل به پروتئینهای TBG، ترانس تیرتین (که قبلاً پره آلبومین نامیده می شد) و آلبومین منتقل می شود اما تمایل TBG به T_3 در مقایسه با T_4 کمتر است، لذا در مقایسه با تیروکسین، کسر بیشتری از T_3 به شکل آزاد وجود دارد(0.3% ازT_3 در مقایسه با 0.02% از T_4). معذالک به دلیل تولید روزانه سه برابری T_4 در مقایسه با T_3، مقدار مطلق T_4 آزاد بیش از T_3 آزاد است. بخش فعال بیولوژیک هورمون های تیروئیدی بخش آزاد این هورمون هاست. محرک اصلی تولید هورمون های تیروئیدی هورمون تیروتروپین یا TSH مترشحه از هیپوفیز است که خود تحت کنترل هورمون آزادکننده تیروتروپین (TRH)تولید شده توسط هیپوتالاموس است که هر دو تحت کنترل T_3و T_4 هستند.

هورمون های تیروئیدی باعث تقویت بسیاری از اعمال داخل سلولی شده و رشد و تمایز سلول را پیش می برند. هورمون های تیروئیدی مصرف اکسیژن و تولید ATP، متابولیسم میتوکندریال، سنتز و متابولیسم کربوهیدرات ها، سنتز و تجزیه کلسترول و تری گلیسریدها(به عنوان مثال از طریق تنظیم بیان پذیرنده LDL در کبد)، حساسیت بافت ها به کاتکول آمین ها را افزایش می دهند. همچنین باعث افزایش ضربان قلب و انقباض پذیری عضلات قلب می گردد. علاوه بر موارد یادشده هورمون های تیروئیدی در تنظیم متابولیسم کلسیم و فسفر رشد و نمو جنین و کودکان نقش مهمی ایفاء می کنند.

مقدار هورمون T_4 در پرکاری تیروئید افزایش و درکم کاری تیروئید کاهش می یابد، که به ترتیب ممکن است با کاهش یا افزایش TSH همراه باشد. عواملی نظیر حاملگی یا مصرف قرص های ضدبارداری خوراکی و بیماری های التهابی حاد کبدی که باعث افزایش غلظت پروتئینهای اتصالی هورمون تیروئید می گردند، می توانند باعث افزایش میزان هورمون های تیروئیدی تام در سرم شوند، در حالی که مقدار هورمون های آزاد در این افراد طبیعی است. در

این افراد معمولاً TSH در دامنه مرجع قرار دارد. در مواقع حضور عواملی که باعث تغییر درمقدار یا تمایل پروتئینهای اتصالی به هورمون های تیروئیدی می گردند، و بیماری های غیرتیروئیدی(NTI) ،سنجش هورمون آزاد شاخص بهتری در مقایسه با هورمون تام در ارزیابی عملکرد تیروئید به ویژه در مواقع پرکاری تیروئید است.

اساس آزمایش :

مبنای کیت سنجش Free T4 شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس بر پایه االیزا نوع رقابتی می باشد .در روش آزمایش، FT_4 موجود در استاندارد یا کنترل یا نمونه بیمار با T_4 کونژوگه با آنزیم HRP برای اتصال و اشغال جایگاه های اختصاصی آنتی بادی ضد T_4 متصل به فاز جامد(چاهک میکروتیتر) به رقابت می پردازند. هرچه مقدار FT_4 موجود در نمونه بیشتر باشد، جایگاه های بیشتری از آنتی بادی فاز جامد را اشغال می کند. سپس اجزای متصل نشده طی شستشو از محیط خارج و با افزودن محلول سوبسترا - رنگزا و انکوباسیون بمدت 15 دقیقه رنگ آبی بوجود می آید. با افزودن محلول متوقف گر، واکنش آنزیمی متوقف می گردد و در نهایت شدت جذب نوری در 450 نانومتر اندازه گیری می شود. شدت رنگ تولید شده با مقدارFT4 موجود در سرم نسبت معکوس دارد .

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

1. سمپلرهای25، 50 و 100 میکرولیتری دقیق. سمپلر 8 کاناله با قابلیت پیپتینگ 50 تا 100 میکرولیتر و یا دیسپنسر اتوماتیک، اگرچه ضروری نیست ولی باعث بهبود قابل توجه تکرارپذیری و صحت نتایج می گردد.
2. آب مقطر با هدایت الکتریکی مطلوب کم تر از 1µs/cm
3. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر 450 نانومتری و در صورت امکان 630 نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.
4. کاغذ جاذب رطوبت یا رطوبت گیر
5. دستگاه واشر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر 8 کاناله یا سرنگ که قادر به ریختن 350 میکرولیتر محلول شستشو باشد.

نگهداری کیت :

1. کیت پس از تحویل باید در دمای 8-2 درجه سانتی گراد (یخچال) نگهداری شود. کلیه معرف ها و اجزاء کیت تا تاریخ انقضاء مندرج برروی جعبه کیت، به شرط نگهداری در دمای یادشده، پایدار هستند. ***هرگز فراتر از تاریخ انقضاء مندرج برروی جعبه از کیت استفاده نکنید.***
2. غلظت کالیبراتورها و نیز دامنه قابل قبول نمونهٔ کنترل بر روی ویال درج شده است و ممکن است بین شناسه های مختلف ساخت تفاوت داشته باشد.
3. از انجماد کیت یا اجزاء کیت خودداری نمایید.

4. میکروپلیت باید در کیسه در بسته به همراه نمگیر نگهداری شود. در هنگام استفاده پس از رسیدن دمای کیسه میکروپلیت به دمای اتاق، تعداد لازم استریپ را از کیسه آلومینیومی خارج و مابقی همراه نم گیر بلافاصله به کیسه منتقل و درب کیسه با دقت بسته و به یخچال منتقل گردد.
5. محلول شستشو باید روزانه و تازه تهیه شود و در همان روز تهیه مصرف شود.
6. تغییر در خصوصیات فیزیکی معرف ها نظیر وجود ذرات معلق در آنها اغلب حاکی از آلودگی و خرابی معرف ها می باشد.
7. محلول سوبسترا-رنگ زا باید بی رنگ باشد. وجود رنگ آبی در این محلول نشان از خرابی و آلودگی آن دارد و باید دور ریخته شود.
8. کیت های باز شده اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شوند، حداکثر به مدت 8 هفته پایدار خواهند بود.
9. اجزاء کیت ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابه جایی درب معرف ها جلوگیری شود.
10. استفاده از سر سمپلر یکبار مصرف برای دقت و صحت و پرهیز از آلودگی برای برداشتن نمونه ها، استانداردها و کنترل ها ضروری است.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

1. سرم یا پلاسمای EDTA نمونه مناسب برای این آزمایش است.
2. از نمونه های با کدورت بالا، همولیز یا لیپمیک ترجیحاً استفاده نشود.
3. در صورتی که انجام آزمایش در همان روز جمع آوری نمونه امکان پذیر نباشد، نمونه ها را می توان برای مدت 48 ساعت در دمای 2 تا 8 درجه سانتیگراد نگه داری کرد. برای مدت طولانی تر نمونه ها باید در-20°C سانتیگراد نگهداری شود.
4. از ذوب و انجماد مکرر نمونه ها اجتناب شود. نمونه های منجمد باید قبل از آزمایش به آرامی، اما به طور کامل مخلوط شده تا کاملاً یکنواخت و همگن گردد.

احتیاطات و هشدارها

1. کیت فقط برای تشخیص طبی آزمایشگاهی کاربرد دارد.
2. کلیه معرف های کیت برای سنجش مستقیم FT_4 سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده اند و برای سنجش FT_4 سایر مایعات بیولوژیک یا پلاسمای غیر EDTA مناسب نمی باشد.

3. قبل از آغاز سنجش، دستورالعمل پیش رو را بدقت مطالعه نموده و اطمینان حاصل کنید که تمامی نکات آن را بخوبی فراگرفته اید. همواره از ویرایش معتبر و به روز دستورالعمل که همراه کیت بسته بندی شده است، استفاده کنید.
4. کلیه جوانب ایمنی دراجرای آزمایش رعایت شود. برای آگاهی از احتیاطات لازم به "راهنمای اصول کلی حفاظت و پیشگیری از آلودگی کارکنان و محیط آزمایشگاه (روش های صحیح میکروب شناسی وتکنیک های صحیح آزمایشگاهی)" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش 1393 مراجعه نمایید.
5. از تماس تمام معرف ها به ویژه محلول توقف که حاوی اسیدکلریدریک 1 مولار است با پوست جلوگیری شود. در صورت تماس با آب و صابون شستشو داده شود.
6. در این کیت برای ساخت برخی اجزا از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر آنتی بادی علیه HIV-1 and 2 و HCV و آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B(HBsAg) ، منفی گزارش شده اند، ولی از آنجایی که هیچ آزمایشی نمی تواند به طورکامل ایمنی یک نمونه با منشاء انسانی را تضمین نماید، با آن همانند یک نمونه بالقوه عفونی رفتار نمایید.
7. با کلیه نمونه های بیمار به عنوان نمونه های بالقوه عفونی برخورد نمایید.
8. برخی از معرف ها حاوی سدیم آزاید به عنوان نگهدارنده می باشند. سدیم آزاید ممکن است با سرب و مس موجود در لوله کشی آب شهری واکنش داده و تولید آزایدهای فلزی قابل انفجار کند. جهت آگاهی از نحوه وارهایی پس ماندهای آزمایشگاهی به "دستورالعمل نحوه مدیریت پسماندهای آزمایشگاهی" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش 1394 مراجعه نمایید.

آماده سازی معرف ها:

1. همه معرف ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (27-20درجه سانتیگراد) برسند.
2. تهیه محلول شستشو: برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ **(20X)** را با 19 حجم آب مقطر رقیق نمائید.

نکات مهم در انجام تست:

1. فرایند شستشو از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. شستشوی ناکافی باعث عدم جداشدن پیوندهای غیراختصاصی و جذب نوری زمینه (Background) می گردد.

2. کیفیت آب مقطر مصرفی در کیفیت محلول شستشو و جدا کردن پیوندهای غیراختصاصی اهمیت زیادی دارد.
3. در مواردی که مقدار FT_4 نمونه بیش از 10 ng/dL باشد، نمونه را با یک سرم دیگر با محتوای FT_4 پایین رقیق و سپس آزمایش را تکرار نموده و مقدار FT_4 را در نمونه اولیه محاسبه کنید در نظر داشته باشید که در محاسبه مقدار FT_4 نمونه بالا، محتوای FT_4 نمونه ای را که برای رقیق سازی انتخاب کرده اید را نیزمدنظر قرار دهید .
4. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.
5. دمای مطلوب محیط آزمایشگاه برای آزمایش های الایزا20 تا27 درجه سانتیگراد می باشد.
6. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.
7. بهتراست استانداردها، کنترل ها و نمونه ها را به صورت دوتایی(Duplicate) و ترجیحاً در دو چاهک عمودی آزمایش کنید و میانگین جذب نوری دو چاهک جهت محاسبه نتایج مورداستفاده قرار گیرد.
8. جهت پیپت کردن محلول سوبسترا-رنگ زا و محلول توقف از میکروپیپت های حاوی ***قطعات فلزی استفاده نکنید***.
9. زمان های انکوباسیون و دمای انکوباسیون را با دقت رعایت کنید.
10. برای اجتناب از بروز خطای رانش یا Drift ناشی از اختلاف زمانی انجام واکنش در چاهک های ابتدایی با چاهک های انتهایی، اگر کل پلیت هم زمان ران می شود، برای پرهیز از خطای ناشی از اختلاف زمانی، از تجهیزاتی نظیر دیسپنسر اتوماتیک یا سمپلر هشت کاناله برای ریختن معرف ها استفاده شود یا بیش از شش استریپ در هر بار ران نشود.
11. در هر بار انجام آزمایش منحنی کالیبراسیون را مجدد ترسیم نموده و برای محاسبه نتایج از منحنی ذخیره شده استفاده نکنید.
12. مراحل آزمایش را بدون وقفه انجام دهید. وقفه بین مراحل باعث نتایج کاذب می گردد.
13. در کلیه مراحل انجام آزمایش و متعاقب هر مرحله پیپتینگ، چاهک ها از نظر وجود حباب بررسی شوند. در صورت وجود حباب با ضربه آهسته به پلیت از محیط خارج شوند.
14. هر نوع نمونه یا ماده کنترلی که حاوی سدیم آزاید یا تیومرسال باشد، با این کیت سازگار نبوده و آزمایش برروی آنها ممکن است به حصول پاسخ های کاذب بیانجامد.

روش انجام آزمایش:

1- تعداد مناسب چاهک های پوشیده شده از آنتی T_4 ، برای استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار را بصورت دوتایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده نمگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.

2- 25 میکرولیتر از استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار به داخل هر چاهک بریزید.

3- 100 میکرولیتر از محلول کونژوگه T4-HRP، به تمام چاهک ها اضافه کنید.

4- پلیت را بمدت 15 ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها به خوبی مخلوط شوند. سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا بمدت 45 دقیقه در دمای اتاق(20-27°C) انکوبه کنید.

5- محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را طبق دستورالعمل زیر شستشو دهید:

- . برای شستشوی چاهک ها، ابتدا 350 میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک ها را وارونه کرده و همراه با تکان دادن خالی کنید و عمل شستشو را چهار بار دیگر (جمعاً به مدت 5 بار) تکرار کنید. در انتهای شستشو، با ضربه زدن ملایم پلیت بر روی کاغذ جاذب رطوبت تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.
- بهتراست برای شستشو از دستگاه های اتوماتیک واشر که قابل برنامه ریزی است استفاده نمایید. که در این صورت به دستورالعمل دستگاه شستشو مراجعه نمایید.

6- 100 میکرولیتر از سوبسترا-رنگ زا آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را بمدت 15 دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

7- 50 میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همان ترتیبی که محلول سوبسترا- رنگ زا اضافه نمودید، به همه چاهک ها اضافه کنید. سپس حداکثر ظرف مدت 10 دقیقه جذب نوری هر چاهک را در طول موج 450 نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول موج 630 نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید).

محاسبه نتایج:

1. با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها برروی محور عمودی (محور Y) و غلظت مشخص آنها برروی محور افقی(محور X) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد را از طریق ترسیم خطوطی که از تمامی نقاط تلاقی عبور کرده باشد،ترسیم کنید.

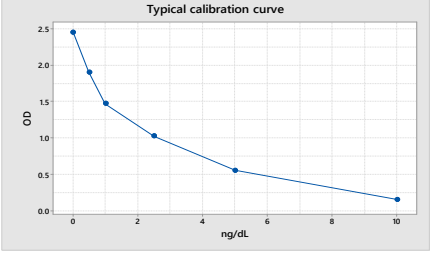
2. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

3. در صورتی از اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت که مجهز به سیستم پردازش داده های داخلی است استفاده می کنید، جهت محاسبه نتایج و ترسیم منحنی کالیبراسیون به دستورالعمل دستگاه مراجعه نمایید. برای محاسبه نتایج کیت FT_4 شرکت پیشگامان سنجش از مدل محاسباتی نقطه-به-نقطه(Point-to-point) استفاده کنید.

داده های نمادین منحنی کالیبراسیون

مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل بعنوان داده های نمادین آورده شده است. لازم به یادآوری است این داده ها فقط جنبه راهنمایی داشته و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید براساس نتایج بدست آمده در آزمایشگاه خویش ترسیم نماید.

Row	ng/dL	OD
1	0.0	2.45
2	0.5	1.90
3	1.0	1.47
4	2.5	1.02
5	5.0	0.55
6	10.0	0.15



با ضرب مقدار FT4 برحسب ng/dL در ضریب 12.9 مقدار FT4 برحسب pmol/L بدست می آید.

کنترل کیفی:

در هر کیت یک نمونه کنترل وجود دارد که مقادیر موردانتظار برای آن برروی برچسب ویال درج شده است. علاوه بر کنترل داخل کیت، آزمایشگاه می تواند از نمونه های سرم انباشته(Pooled serum) که در خود آزمایشگاه تهیه شده یا نمونه های کنترل خارجی مشروط به پایداری **FT4** در نمونه طی روزهای اجرای برنامه کنترل کیفی داخلی، نیز استفاده نماید. در دو حالت یادشده لازم به ذکر است که آزمایشگاه باید مقدار هدف ، انحراف معیار نتایج

و کرانه های بالایی(UCL) و پایینی(LCL) قابل قبول را خود محاسبه و مبنای برنامه های کنترل کیفی خویش قرار دهد.

بازه مرجع :

در یک بررسی که برروی سرم تعدادی از مراجعه کنندگان چندین آزمایشگاه مختلف در سطح استان تهران به عمل آمد ، دامنه مرجع زیر برای گروه های مختلف سنی و جنسی براساس درون یابی دامنه بین ٪2/5 و ٪97/5 مرکزی با استفاده از کیت FREE T_4 الایزا شرکت پیشگامان بدست آمد. لازم به ذکر است به دلیل تفاوت های بیولوژیک بین جمعیت های مختلف، و همچنین عواملی نظیر سن، جنس، نژاد و عوامل جغرافیایی هر آزمایشگاهی باید ابتدا انتقال پذیری(transferability) این داده ها را درخصوص جمعیت موردنظر خویش راستی آزمایی (Verification) کرده و درصورت مشاهده ناهمخوانی، بازه مرجع خود را بدست آورد:

گروه سنی	2.5^{th}-97.5^{th} percentile(ng/dL)
نوزادان 1 تا 4 روز	2.2 to 5.3
نوزادان 5 تا 15 روز	1.1 to 3.2
نوزادان 16 تا 30 روز	0.7 to 2.5
نوزادان 1 تا 12 ماهه	0.9 to 1.8
1 تا 19 سال	0.9 to 1.4
بالاتر از 19 سال	0.8 to 1.5

خصوصیات اجرایی کیت

1- حد پایینی اندازه گیری(Lower limit of measurement) :

حد شاهد(Limit-of-Blank:LOB) و حد آشکارسازی(Limit-of-detection: LOD)مطابق با راهنمای EP 17-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI) بدست آمد.

به طور خلاصه حد بلانک تحت عنوان مقدار صدک 95 ام (95^{th} percentile) از60 بار اندازه گیری برروی نمونه شاهد(استاندارد صفر) طی چندین ران بدست آمد. حد شاهد(LoB) معادل غلظتی درنظر گرفته شد که 95٪ از60 نتیجه اندازه گیری های تکراری مقداری کمتر از آن بدست دهد. برای تعیین حد آشکارسازی 20 اندازه گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم(n=20×3=60) با محتوای FT_4 کمتر از 0.3ng/dL که مقدار FT_4 آن به روش مستقل دیگری تعیین شده بود طی سه روز انجام شد و بزرگترین انحراف معیار اندازه گیری های تکراری بر روی

سه نمونه یادشده مبنای تعیین حد آشکارسازی قرار گرفت. از رابطه زیر حد آشکارسازی پس از گرد کردن روبه بالامعادل 0.2 ng/dL تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645SD_{Low}$$

2- دقت(Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت FT_4شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس و 3 انباشته سرمی تهیه شده از نمونه های بیمار، در سه نقطه مختلف بازه اندازه گیری مطابق با راهنمای EP 05-A3 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI) بدست آمد.

طی 10 روزکاری، سه کاربر و هر یک روزانه سه ران اندازه گیری های تکراری به صورت دوتایی در هر ران بروی نمونه های یاد شده انجام دادند(2×3×3×10). نتایج با روش آماری **Fully nested ANOVA** تحلیل گردید:

خلاصه نتایج در جدول زیر آورده شده است:

Sample Description	Mean (ng/dL)	Repeatability		Within-Laboratory Precision	
		SD	%CV	SD	%CV
Patient Pool	0.86	0.06	6.98	0.08	9.3
Patient Pool	1.2	0.07	5.83	0.06	5.0
Patient Pool	2.2	0.11	5.00	0.13	5.91

3- اختصاصیت(Specificity):

ارزیابی اختصاصیت مطابق با راهنمای EP 07-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI)، جهت تعیین واکنش متقاطع(cross reaction) کیت سنجش FT_4 پیشگامان سنجش ایساتیس با سایر ترکیبات مشابه هورمون T_4 انجام گرفت. نمونه های حاوی واکنشگرهای متقاطع از طریق spike کردن سرم انسانی طبیعی با مواد حاوی سطوح بالایی از همان واکنشگرها به گونه ای که ماتریکس سرم بیش از 10 درصد تغییر نکند،تهیه شد. سپس مقدار FT_4 همزمان در یک ران در نمونه هایی که با ماتریکس بی اثرspike شده بودند و نمونه هایی که با واکنشگرهای متقاطع spike شدند، اندازه گیری شد و مقدار واکنش پذیری متقاطع هر نمونه از رابطه زیر محاسبه شد و به صورت نسبت به غلظت FT_4 اولیه بیان گردید. نتایج در جدولی که در ادامه می آید خلاصه شده است:

Tested hormones	Cross Reactivity%	Concentration
d-Triiodo-thyronine	2.5	0.33
Monoiodo-Tyrosine	1.4	0.24
Diiodo-Tyrosine	ND	0.34

$$\%\mathbf{cross-reactivity} = \frac{\boldsymbol{mean\ conc.\ of\ spiked\ sample - mean\ conc.\ of\ unspiked\ sample}}{\boldsymbol{spiked\ conc.}} \times \mathbf{100}$$

در این کیت هموگلوبین تا 50 mg/mL، بیلیروبین تا 20 mg/dL و تری گلیسریدها تا 1000 mg/mL تأثیری بر سنجش ندارد(%intereference≤10%).

4- خطی بودن(Linearity):

ارزیابی خطی بودن از طریق رقیق سازی متوالی سه نمونه با محتوای FT_4 مختلف با ماتریکس پروتئینی عاری از FT_4 و مقایسه نتایج حاصل از سنجش FT_4 برروی نمونه های رقیق شده(Observed value) با نتایج موردانتظار که از ضرب مقدار FT_4 اولیه در ضریب رقت بدست آمده بود(Target value)، انجام پذیرفت. نتایج در جدول زیر خلاصه شده است.

Samples	Primary conc.(ng/dL)	Recovery%		
		1:2	1:4	1:8
1	2.27	108	110	107
2	2.04	98	102	108
3	3.054	101	105	104

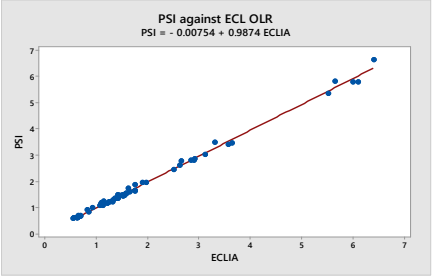
5- درستی(Trueness):

5-1- ارزیابی مقایسه ای(Method comparison)

ارزیابی مقایسه ای بین نتایج اندازه گیری کیت سنجش FT_4 سرم شرکت پیشگامان و روش ECLIA- Cobas E411-Roche diagnostic (n=60 range:0.5-8.4 ng/dL) انجام و مطابق با راهنمای EP 09-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI) به روش رگرسیون خطی تحلیل گردید. در این ارزیابی

نتایج کیت پیشگامان برروی محور عمودی(محور **y**ها) و نتایج **روش** ECLIA برروی محور افقی(محور **x**ها) مشخص و نمودار رگرسیون خطی ترسیم گردید. خلاصه نتایج و نمودار رگرسیون خطی(Linear regression) در ادامه آورده شده است:

PSI=-0.00754+0.9874ECLIA
R-sq=0.9957



منابع و مراجع:

1. **CLSI. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved** guideline.2nd ed. CLSI document EP 17-A2. Pierson-Perry J.F. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2012.

2. CLSI. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline. CLSI document EP 05-A3. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2014.

3. CLSI. Interference Testing in clinical chemistry; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP07-A23. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2005.

4. Jameson A.S. et al. (2018). Harrison's principles of internal medicine.20th ed.(pp. 6601-20) Mc Graw Hill Educatio

5. Pagana K.D. et al. (2018). Mosby's Manual of diagnostic and Laboratory tests.6th ed. (pp. 442-45). Elsevier Inc.

6. Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics.6th ed. (pp. 1579-1580)Elsevier Inc.

خطایابی در آزمایش های الایزا

نوع مشکل	علت مشکل	راه حل
پایین بودن OD استانداردها و نمونه ها	افت و یا آلودگی کونژوگه	تکرار تست با کونژوگه جدید
	پایین بودن دما و یا کوتاه بودن زمان انکوباسیون، به دما نرسیدن محلولهای کیت و نمونه بیماران	1.دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید. 2.قبل از شروع آزمایش کیت و نمونه بیماران به دمای اتاق برسد.
	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	1.PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. 2.پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	1.پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. 2.پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.
	طول موج خوانش نامناسب (405 nm بجای 450nm)	1.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. 2.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید.

صحیح نبودن نمودار استانداردها	پیپتینگ نامناسب	1.استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف 2.از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید. 3.توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. 4.توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود.
	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	1 . PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. 2.پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD	آلودگی استاندارد صفر	تکرار تست با استاندارد های جدید
	آلودگی محلول رنگزا	استفاده از محلول رنگزا جدید
	آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نامناسب	1.عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. 2. تمام سوزن های دستگاه واشر را چک کنید.
	طول موج نامناسب در خوانش	1.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. 2.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. 3.از فیلتر 630 نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید.
	آلودگی محلول Stop	تکرار تست با محلول Stop جدید
عدم تولید رنگ در چاهک ها	استفاده از مواد سایر کیت ها	تکرار تست با مواد همان کیت
	انجام نشدن مرحله ای از تست	تکرار تست
	آلودگی محلول رنگزا	تکرار تست با محلول رنگزا جدید

	آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید	تکرار تست با محلول کونژوگه جدید
عدم تکرار پذیری مناسب	پیپتینگ نامناسب، گرفتگی لوله داخلی سمپلر بواسطه آلودگی	1. استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف 2. از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید 3. توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. 4. توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نشود. 5. توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد. 6. کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلر ها
	طولانی شدن زمان انجام تست	فاصله زمانی بین اضافه کردن استاندارد ها و نمونه نباید بیشتر از 10 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.
	باقی ماندن کونژوگه در لبه چاهکها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک ها	پیپتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	وجود حباب در چاهک ها	در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک ها نباشد.
	کثیف بودن کف چاهکها	کف چاهکها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید.
	مخلوط نشدن محلول های کیت	قبل از استفاده، ویال محلول ها را به آرامی تکان دهید.