

کیت اندازه گیری **Free T4** در سرم انسان  
**Free T4 ELISA Kit 96t**  
 Cat. No: 3124-96 / Rev: A2 (1402/04/17)

#### مقدمه:

تیروکسین، هورمون اصلی غده تیروئید است که بخش اعظم آن توسط پروتئین های حامل در خون جریان دارد. تیروکسین آزاد (FT4) که به پروتئین حامل متصل نیست، مسئول اصلی اعمال بیولوژیکی این هورمون است. اندازه گیری سطح سرمی FT4 به منظور بررسی عملکرد تیروئید و بیماری های مرتبط با آن اهمیت دارد. در شرایطی نظیر بارداری، استفاده از قرص های ضد بارداری و استروژن درمانی غلظت پروتئین های حامل تیروکسین تغییر می کند که با تغییرات کاذب تیروکسین تام (TT4) همراه خواهد بود؛ درحالی که غلظت FT4 به صورت ثابت و نرمال باقی می ماند. حیطه کاربرد این کیت اندازه گیری کمی غلظت تیروکسین آزاد در سرم انسان به روش الایزا است.

#### اصول آزمایش:

این تست بر اساس الایزای رقابتی طراحی گردیده و آنتی بادی ضد FT4 در کف چاهک ها تثبیت شده است. نمونه های حاوی FT4 به همراه FT4 کونژوگه شده با آنزیم HRP در چاهک ها ریخته می شوند و دو آنتی ژن با یکدیگر برای واکنش با آنتی بادی رقابت می کنند. پس از شستشوی چاهک ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی تولید می شود که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. شدت جذب نوری هر چاهک با غلظت FT4 موجود در نمونه، کالیبراتور و یا کنترل رابطه معکوس دارد. در نهایت غلظت FT4 در نمونه ها توسط منحنی استاندارد (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می گردد.

#### محتویات کیت:

(۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی آنتی بادی تثبیت شده.

(۲) کالیبراتور (FT4 Cal A-F): شش ویال با غلظت های نوشته شده بر روی لیبل ویال آن ها.

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

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

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

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

(۷) محلول متوقف کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری.

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

(۹) پرچسب مخصوص پلیت: یک ورق.  
 توجه ۱: کلیه محلول ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده 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 ویال ها و گواهی آنالیز محصول (COA) می باشد.

توجه ۲: مقادیر کنترل (ها) در 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 هم بین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت ها و یا شماره های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.

(۲) کلیه محلول ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول هایی که تاریخ انقضاء آن ها گذشته است استفاده نشود.

(۳) توجه فرمایید محلول ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.

(۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBs Ag، HIV1/2 و HCV بررسی شده اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری زا با استفاده از روش های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل های 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 م واد با دهان و سایر مخاط جلوگیری نمایید.

(۶) نمونه بیماران، کنترل ها، چاهک ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

#### جمع آوری، آماده سازی و نگهداری نمونه:

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

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

#### آماده سازی و نگهداری معرف ها:

(۱) آماده سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری نمایید.

(۲) آماده سازی محلول رنگزا: محلول های رنگزا A و B را با حجم های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی لیتر

از محلول رنگزا B اضافه کنید) و به مدت 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 نمونه ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی گراد) رسیده اند. کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.

(۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک ها را به همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

(۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از نمونه های سرم، کالیبراتورها و کنترل در چاهک های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک ها ریخته شود.

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

(۴) چاهک ها را با پرچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

(۵) محتویات چاهک ها را با وارونه کردن پلیت یا آسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت گیر بزنید. به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت اقدام نمایید.

(۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده شده (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

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

1: <http://www.idealdiag.com/Training.aspx>



علائم استفاده شده در برچسب 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>REF</b>                                                                        | Catalogue number                                    |
|  | Contains sufficient for tests                       |
|  | Temperature limit                                   |
|  | Date of manufacture                                 |

#### References:

- McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
- Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
- 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.

#### (۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست، غلظت  $ft_4$  در رقت‌های 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           | -0.4   | -1.3 | -2.5 | 3.0  |
| 2   | 6.13           | 1.1    | -2.1 | -2.7 | -3.2 |
| 3   | 6.94           | 1.2    | -1.4 | 2.0  | -3.4 |

#### (۵) بررسی ویژگی-آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)

ویژگی این آزمایش با کمک اضافه کردن ترکیبات مندرج در جدول زیر به نمونه سرم، سنجش شد. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت غلظت ماده اضافه شده به غلظت  $ft_4$  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-Thyroxine         | 1                | -                    |
| D-Thyroxine         | 0.9800           | 10 $\mu\text{g/dl}$  |
| D-Thriiodothyronine | 0.0150           | 100 $\mu\text{g/dl}$ |
| L-Thriiodothyronine | 0.0300           | 100 $\mu\text{g/dl}$ |
| Iodothyrosine       | 0.0001           | 100 $\mu\text{g/ml}$ |
| Diiodothyrosine     | 0.0001           | 100 $\mu\text{g/ml}$ |
| Diiodothyronine     | 0.0001           | 100 $\mu\text{g/ml}$ |

#### (۶) 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  $0.32 \text{ ng/dL}$  تعیین گردید.

$$\begin{aligned} \text{LOD} &= \text{LOB} + 1.645 \text{ SD}_s \\ \text{LOB} &= \text{Mean}_b + 1.645 \text{ SD}_b \end{aligned}$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

| Normal Range (ng/dL) |             |
|----------------------|-------------|
| Adult                | 0.8 – 2     |
| Pregnancy            | 0.76 – 2.24 |

#### پارامترهای کنترل کیفی

##### (۱) بررسی دقت-آزمون دقت درون‌دور (Within Run)

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت و سه سطح کنترل در یک نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش  $CV < 10\%$  است.

| Sample / Control | 1    | 2    | 3    | Ctrl 1 | Ctrl 2 | Ctrl 3 |
|------------------|------|------|------|--------|--------|--------|
| No. of Repeats   | 20   | 20   | 20   | 20     | 20     | 20     |
| Mean (ng/dL)     | 0.95 | 3.40 | 6.83 | 0.59   | 2.84   | 4.04   |
| SD (ng/dL)       | 0.05 | 0.16 | 0.29 | 0.03   | 0.12   | 0.17   |
| CV (%)           | 5.3  | 4.7  | 4.2  | 5.1    | 4.2    | 4.2    |

##### (۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین‌دور (Between Run)

دقت بین دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت و سه سطح کنترل در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش  $CV < 10\%$  است.

| Sample / Control | 1    | 2    | 3    | Ctrl 1 | Ctrl 2 | Ctrl 3 |
|------------------|------|------|------|--------|--------|--------|
| No. of Repeats   | 20   | 20   | 20   | 20     | 20     | 20     |
| Mean (ng/dL)     | 1.11 | 4.22 | 6.44 | 0.68   | 2.93   | 4.13   |
| SD (ng/dL)       | 0.07 | 0.21 | 0.28 | 0.04   | 0.13   | 0.18   |
| CV (%)           | 6.3  | 5    | 4.3  | 5.8    | 4.4    | 4.3    |

##### (۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

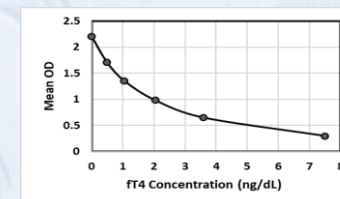
در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب گردیده و به‌عنوان یک نمونه غلظت  $ft_4$  در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش  $Bias < 10\%$  نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

| No. | Sample (ng/dL) | Added (ng/dL) | Exp. (ng/dL) | Obs. (ng/dL) | % Rec. |
|-----|----------------|---------------|--------------|--------------|--------|
| 1   | 7.10           | 2.22          | 4.66         | 4.48         | 96.1   |
| 2   | 1.56           | 4.83          | 3.19         | 3.05         | 95.6   |
| 3   | 3.94           | 0.69          | 2.31         | 2.36         | 102.2  |

(۷) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی 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 فرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). در این آزمایش محاسبه غلظت به روش Point to Point و 4PL (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 بگیرد. 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          | 2.120 | 2.205   | 0             |
|            | B1          | 2.290 |         |               |
| Cal. B     | C1          | 1.652 | 1.712   | 0.49          |
|            | D1          | 1.772 |         |               |
| Cal. C     | E1          | 1.302 | 1.354   | 1.05          |
|            | F1          | 1.406 |         |               |
| Cal. D     | G1          | 0.960 | 0.981   | 2.05          |
|            | H1          | 1.002 |         |               |
| Cal. E     | A2          | 0.698 | 0.651   | 3.6           |
|            | B2          | 0.604 |         |               |
| Cal. F     | C2          | 0.305 | 0.299   | 7.5           |
|            | D2          | 0.293 |         |               |



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزی  $ft_4$

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