راهنمای کیت

Free T4

مقدمه:

تیروکسین(T4) هورمون اصلی تیروئید است که با توجه به حلالیت کم این هورمون در محیط آبی ،بخش عمده آن(حدود 95%)به پروتئینهای حامل متصل بوده و بخش کوچکی بصورت آزاد در خون وجود دارد کهدارای فعالیت فیزیولوژیگ بوده و اندازه گیری آن شاخص مهمتری از تیروکسین تام است زیرا تیروکسین تام تحت تاثیر میزان پروتئین های حامل قرار می گیرد.فرم فعال متابولیک و قابل قبول موجود در بافت ها فرم FT4 است.

کاربرد بالیني آزمایش:

در هیپرتیروئیدیسم و هیپوتیروئیدیسم درمان شده با تیروکسین FT4 بالا میرود همچنین در سندرم گریوز و تیروتاکسیوز نیز مقدار FT4 بالا میرود .در زمان حاملگی و در هیپوتیروئیدیسم و هیپرتیروئیدیسم درمان شده با تری یدونین ودر هیپوتیروئیدیسم با منشا هیپوفیز و هیپوتالاموس مقدار FT4 پائین می آید. نوسانات FT4 ممکن است در بیماران Euthyroid و در زمان بیماری های Non thyroid حاد و مزمن اتفاق بیفتد.

محدوده طبیعی:

مقادیر نرمال Free T4 در سرم افراد طبیعی که توسط تستهای مکرر الایزا بدست آمده بقرار زیر می باشد ولی پیشنهاد می گردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد.

محدوده طبیعی	2.1-0.6 ng/dl

برای بیمارانی که از داروی Levothyroxine استفاده می کنند، 5 ng/dl نیز نرمال است.

اساس آزمایش :

اساس این کیت به روش رقابتی می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادی منوکلونال بر علیه یک واحد آنتی ژنیک T4 , Coat میشوند. استاندارد ها ونمونه بیماران با آنتی بادی Coat شده در چاهکها مجاور می شود و سپس محلول اسی بافر(assay buffer) و پس از انکوباسیون T4 متصل به HRP به چاهکها اضافه میشوند که این T4 کنژوگه با T4 موجود در نمونه در اتصال به آنتی بادی های 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 وبالعکس. در ادامه پس از شستشو ، محلول رنگزا که حاوی H2O2 و کروموژن است به داخل چاهکها ریخته میشود و تولید رنگ آبی می کند که رنگ آبی تولید شده به صورت معکوس با غلظت T3 موجود در نمونه ها متناسب است. با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل میشود که بهترین جذب نوری را در طول موج 450 نانومتر دارد.

جمع آوري و أماده سازي نمونه :

نمونه سرم ارجح است ولي از پلاسماي هپارینه یا همراه با EDTA هم استفاده کرد ،سرم T4 خیلی پایداراست و مي تواند به مدت 7 روز در دماي اتاق ویا براي مدت طولاني تر دریخچال و 20- نگهداري شود(حد اکثر تا 30 روز). از فریز و ذوب کردن نمونه باید اجتناب کرد.

واکنش تداخلی:

داروهای آمیودارون ، آسپرین ، دانازول ، پروپرانولول و فورسماید بالا برنده Free T4 هستند وآنتی اپی لپسی ها(ضد صرع ها)مثل فنی توئین و کاربامازین و متادون و ریفامپین وهپارین پائین آورنده اند.

محتویات کیت :

1- یک عدد پلیت حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد T4 (Anti –T4 coated Plate) دارای 96 چاهک
2- سری استاندارد (Standard Set) : 6 ویال استاندارد دارای غلظت های ng/dl صفر، 0.2، 1، 2.5، 5،10 که هر ویال محتوی 0.5 میلی لیتر می باشد.
3- سرم کنترل (Control Serum) : یک ویال حاوی 0.5 میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص نوشته شده روی برچسب ویال.
4- محلول رقیق کننده نمونه ها (Sample Diluent) : یک ویال حاوی 1 میلی لیتر برای رقیق کردن نمونه هائی که غلظت بالاتری از بالاترین استاندارد کیت را دارا می باشند.
5- محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی 12 میلی لیتر محلول حاوی T4 کنژوکه شده با HRP .
6- محلول شستشو (Washing Solution) : یک ویال حاوی 40 میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (25 X) که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف مقدار لازم از محلول شستشوی غلیظ را به نسبت 1/25 با آب مقطر رقیق کنید.
7- محلول رنگزا (Chromogen Substrate) : یک ویال محتوی 12 میلی لیتر و آماده برای مصرف.
8- محلول متوقف کننده (Stop Solution) :یک ویال محتوی 12 میلی لیتر.
10- بر چسب مخصوص پلیت (Card Board Sealer)

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

1- دستگاه خوانش الایزا (Eliza Reader) دارای فیلتر 450 نانومتر ودر صورت امکان 630 به عنوان فیلتر رفرانس.
2- سمپلر های 25 و50 و 100 میکرولیتر دقیق
3- آب مقطر

نکات قابل ذکر براي مصرف کنندگان :

1- محتویات این کیت براي مصرف در همین کیت مي باشد .
2- از مخلوط کردن محتویات کیتها باشماره ساختهاي مختلف جدا" خودداري نمائید .
3- کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمي دارند از نظر وجود HIV,HCV, HBs AG کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل مي باشند . جهت احتیاط بهتراست هر کاربري که با کیت کار مي کند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزد .

توضیحات عمومي:

1- قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق رسانده و به خوبي تکان دهید تا کاملا" یکنواخت شوند.
2- بهتراست به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند .
3- ازنوك سمپلر يك بار مصرف براي هر نمونه استفاده کنید .

4- پس از افزودن محلول متوقف کننده ، جذب نوري چاهكها حداكثر تا نيم ساعت قابل قرائت مي باشد .
5- براي كسب نتايج مطلوب بايد شستشوي چاهكها بصورت كامل صورت گرفته وآخرين قطرات پس از شستشو از چاهكها تخليه شوند .
6- از مهمترين فاكتورها در حصول نتيجه مطلوب ، زمان انكو باسيون مناسب مي باشد ، بنابراين پيشنهاد مي گردد قبل از شروع آزمايش تمام مواد و محلولهاي مورد نيازرا آماده نموده و درب محلولهاي مورد نياز را باز كنيد ، اين عمل با كاهش فاصله زماني بين مراحل سمپلينگ باعث نتايج دقيقتري ميشود.
7- بهتر است كه حجم انجام تست محدود باشد وزمان ريختن نمونه ها پيش از5دقيقه به طول نيانجامد .

مراحل انجام آزمايش :

1- تعداد چاهكهاي مورد نظر را انتخاب نموده و باقي چاهكها را به همراه نمگير درون كيسه مخصوص نگهداري پليت قرار داده و درب آن را ببنديد .
2- 25 ميكروليتر از هر استاندارد ، سرم كنترل و نمونه را به داخل هر چاهك بريزيد ، سپس پليت را به آرامي به مدت 15 ثانيه تكان دهيد تا محتويات آن بخوبي مخلوط شوند ، پيشنهاد مي گردد كه از استانداردها و نمونه ها به صورت داپليكيت استفاده شود بدين معني كه هر استاندارد و نمونه را در دوچاهك بريزيد و در انتها از ميانگين جذب نوري آنها براي محاسبه نتايج استفاده كنيد سپس 100 ميكروليتر (Enzyme Conjugate) آنزيم كونزوگه به هرچاهك اضافه نمائيد وبراى 15 ثانيه پليت را تكان دهيد تا محتويات چاهكها خوب مخلوط شوند و آنگاه درب چاهكها را با بر چسب مخصوص پليت پوشانده و چاهكها را به مدت 1 ساعت در درجه حرارت اتاق(22-28 درجه) انكوبه نمائيد.
3- محتويات چاهكها را خالي كرده و چاهكها را 5 بار با محلول شستشوي آماده مصرف بشوئيد (براي شستشو مي توان از سمپلر 8 كاناله استفاده نمود ولي بايد مواظب بود كه محلول شستشو از يك چاهك به چاهك ديگر وارد نشود زيرا مي تواند موجب ايجاد خطا در نتيجه آزمايش گردد). در هر دفعه شستشو حدود 300 ميكروليتر محلول شستشو در هر چاهك ريخته و سپس چاهك ها را درحالت وارونه و با ضربات ملايم بر روي يك پارچه يا كاغذ نمگير بكوبيد تا قطرات اضافي محلول شستشو خارج شوند.
4- 100 ميكروليتر محلول رنگزا (Chromogen – Substrate) به هرچاهك اضافه نمائيد و چاهكها را به مدت 15 دقيقه در درجه حرارت اتاق و درتاريكي انكوبه نمائيد .
5- با اضافه كردن 100 ميكروليتر محلول متوقف كننده (Stop Solution) به هرچاهك ادامه واكنشهاي آنزيمي را متوقف نمائيد . براي سنجش جذب نوري هرچاهك از دستگاه الايزا ريدر با فيلتر 450 nm استفاده نمائيد .
(توصيه مي شود از فيلتر 630 nm به عنوان فيلتر رفرانس استفاده گردد.)

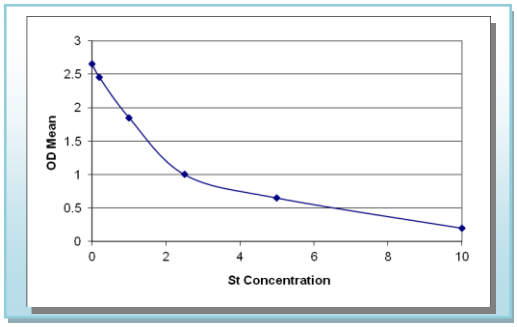
شرايط نگهداري فرآورده تشخيصي:

1- دماي نگهداري كيت بين 2-8 C' مي باشد و بهتراست كه در 4C ' نگهداري شود .
2- با توجه به انجام تست هاي accelerate , Full Term اين كيت درصورت رعايت موارد نگهداري صحيح تا 12ماه پايدار مي باشد ودر اين مدت كيت حاضر بالاي 90 درصد كارايي اوليه را داراست. با توجه به آزمايشات انجام شده در صورت باز نمودن كيت يک ماه پايدار مى باشد .
3- چاهكها را در كيسه مخصوص پليت همراه با نمگير نگهداري نمائيد .
4- **توجه :** درصورت بازشدن درب كيت و محلول ها تازماني كه آلودگي ميكروبي و قارچي رخ ندهد كيت پايدار خواهند بود.

محاسبه نتايج :

1- جذب نوری استاندارد ها و نمونه ها را به کمک دستگاه Eliza Reader در طول موج nm450 و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس nm630 بخوانید.
2- با استفاده از میانگین جذب نوری استاندارد ها 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 ،در ادامه نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمائید تا منحنی بدست آید.
3- میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن را پیدا کنید ، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمائید بطوریکه این خط کاملا بر محور عمودی عمود باشد و در ادامه از محل تلاقی خط و منحنی ،خطی عمود بر محور افقی وارد کنید ، نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد.

	استانداردها (ng/dl)	جذب نوری
St 1	0	2.65
St 2	0.2	2.45
St 3	1.0	1.85
St 4	2.5	1.0
St 5	5.0	0.65
St 6	10	0.2



توجه : جذب های نوری و منحنی مربوط فقط به عنوان نمونه می باشند و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

شاخصهاي اجرائي:

1- حداقل مقدار قابل اندازه گيري :
براساس جذب نوري استاندارد صفر و سه برابر انحراف معيار (SD)حداقل غلظت Free T4 قابل تشخيص در اين كيت 0.1 ng/dl مي باشد .
2- دقت آزمايش :
آزمايشهاي اينترا- اسي (همخواني غلظت مشخص از يك نمونه در يك سري آزمايش) و اينتر- اسي (همخواني غلظت مشخص ازيك نمونه در سري آزمايشهاي مختلف) بااستفاده از4 استاندارد با غلظتهاي مختلف Free T4 انجام گرديد كه در جداول 1و2 آمده است .

جدول شماره 1 (اينترا- اسي)

نمونه	تعداد دفعات تکرار	ميانگين ng/dl	SDng/dl	CV%
1	12	0.2	0.5	6.6
2	12	1	0.03	8.3
3	12	2.5	1.08	5.9
4	12	5	0.25	4.0

جدول شماره 2 (اينتر- اسي)

نمونه	تعداد دفعات تکرار	ميانگين ng/dl	SD ng/dl	CV%
1	5	0.2	0.04	7.0
2	5	1	0.08	5.1
3	5	2.5	0.25	5.0
4	5	5	0.86	4.4

هرسري آزمايش بصورت Duplicate انجام شده است .

3- ريكاوري آزمايش :

مقادير معلومي از Free T4 به 4 سرم با غلظتهاي مشخص Free T4 افزوده شد و ريكاوري آنها محاسبه گرديد كه نتايج آن در جدول زير آمده است .

جدول ريكاوري :

نمونه	مقدار Free T4 موجود درسرم (ng/dl)	مقدار افزوده شده Free T4 (ng/dl)	مقدار مورد انتظار (ng/dl)	مقدار بدست آمده (ng/dl)	ريكاوري (%)
1	0.5	0.3	0.4	0.36	90
1	0.5	0.85	1.1	1.0	90
1	0.5	2.2	1.35	1.4	103
2	0.95	0.3	0.625	0.59	94
2	0.95	0.85	0.9	09.2	102
2	0.95	2.2	1.5	1.5	100
3	1.6	0.3	0.95	1.0	105
3	1.6	0.85	1.2	1.1	91
3	1.6	2.2	1.9	1.75	92
4	3.5	0.3	1.9	1.75	92
4	3.5	0.85	2.1	1.9	90
4	3.5	2.2	2.85	2.5	87

4- خطي بودن آزمايش :

به كمك استاندارد صفر رقتهاي متوالي 4 نمونه استاندارد با غلظت مشخص از Free T4 تهيه گرديد و نتايج بر اساس ضريب رقت محاسبه شد كه درجدول زير نتايج آن آورده شده است .

جدول خطي بودن :

نمونه	مقدار Free T4 موجود دراستاندارد (ng/dl)	ريكاوري (%)			
		رقت 25%	رقت 50%	رقت 75%	100%
1	1.0	92	90	102	94
2	2.5	90	93	96	96
3	5	92	95	91	92

5- اختصاصيت آزمايش :

اختصاصيت اين آزمايش به كمك سرمهايي با غلظتهاي مختلف 3,5-Diiodothyronine و 3,3`,5-Triiodothronine(T3) و 3,3`,5`Triiodonine(rT3) و 3,3`,5-Triiodothyro acetic acid و 3,3`,5-Triiodothyropioonic acid جهت بررسي واكنشهاي متقاطع با Free T4 بررسي شد كه نتايج آن در جدول زير آمده است .

جدول اختصاصيت (واكنش متقاطع) :

(ng/dl) Free T4 غلظت ظاهري	(nmol/L)غلظت	آناليت
<0.1	1000	3,5-Diiodothyronine
<0.1	100	3,3`,5-Triiodothronine(T3)
<0.1	100	3,3`,5`Triiodonine(rT3)
<0.1	100	3,3`,5-Triiodothyro acetic acid
<0.1	100	3,3`,5-Triiodothyropioonicو

References
1. Tietz N.W, Fundamentals of clinical chemistry, 2nd Ed, Pg, 602 Saunders press, Philadelphia, 1976.
2. Barker,S.B. – Determination of protein bound iodine journal biological chemistry, 173, 175, (1948). 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
5. Liewendhal K. (1990) Assessment of thyroid status by laboratory methods: development and prepectives. Scan J. clin. Invest. (Suppl. 201) 83-92
6. Cavalieri RR., Rapoport B. (1977) Impaired peripheral conversion of thyroxine to triiodothyronine. Ann. Rev. Med.28:57-65
7. Spector DA et al . Thyroid function and metabolic state in chronic renal failure Ann. Int. Med. 85:724-730.
8. Burr WA et al (1975) Serum triidothyronine and reverse triiodothyronine concentration after surgical operation. Lancet II

Adress :
No:1161 , Bid Avenue , Payetakht , Industrial zone , Tehran , Iran
Tel : +98 21 66 56 91 84 - 66 59 37 41 Fax : +98 21 66 56 14 28
Email : info@biokarpira.com
www.biokarpira.com

043 ISO 9001-2008 13485