-- Free T4 ELISA KIT

Σ = 96 tests REF: PSF4-01

مقدمه :

به طور تقریبا ۰.۰۳ درصد T۴ به شکل آزاد و غیر متصل به پروتئینهای حامل در جریان خون وجود دارد که این میزان عامل فعالیت های بیولوژیکی این هورمون می باشد. با توجه به اینکه بیش از ۹۹ درصد T۴ بطور برگشت پذیر به سه پروتئین پلاسمائی TBG (Thyroxine Binding Globulin) (۷۰درصد)، پره آلبومین (۲۰ درصد) و آلبومین (۱۰ درصد) متصل می باشد، با این وجود غلظت و ساختار این پروتئینهای حامل در نارسایی یا اختلالات عملکرد کلیه وکبد و همچنین دوران بارداری ممکن است دستخوش تغییرات گردد. این امر می تواند باعث افزایش یا کاهش کاذب در مقادیر Total T۴ گردد. بنا براین اندازه گیری غلظت Free T۴ در تشخیص بیمار یهای تیروئید عامل مهمی محسوب می شود. در واقع غلظت FreeT۴، حالت واقعی کارکرد تیروئید را نشان می دهد و سنجش این میزان از T۴ آزاد از اهمیت خاصی برخوردار می باشد.

اساس روش اندازه گیری:

در این تست الایزا از آنتی بادی منوکلونال اختصاصی که بر علیه یکی از شاخص های آنتی ژنیک مولکول T۴ تهیه شده است، استفاده می شود. به این شکل که چاهکها با غلظت مشخصی از منوکلونال آنتی بادی Anti-T۴ پوشش داده می شوند. مقدار مشخصی سرم و آنتی ژن T۴ کونژوگه شده با آنزیم (HRP) به چاهک اضافه می شود. در زمان انکوباسیون، T۴-HRP و Free T۴ موجود در سرم و استاندارد برای اتصال به آنتی بادی منوکلونال Anti-T۴ موجود در کف چاهکها رقابت می کنند. پس از ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، چاهک ها با محلول شستشو شسته می شوند. با افزودن محلول سوبسترا - رنگزا و انکوباسیون بمدت ۱۵ دقیقه رنگ آبی بوجود می آید. تولید رنگ با افزودن محلول توقف متوقف می گردد و رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که شدت جذب در ۴۵۰ nm اندازه گیری می شود .شدت رنگ رابطه معکوسی با غلظت Free T۴ در نمونه مورد آزمایش دارد.

.معرف ها:

۱. پلیت پوشانده شده با آنتی بادی منوکلونالAnti-T۴ : (۱ پلیت، ۹۶ چاهک).

۲. محلول کونژوگه: ۱ ویال حاوی T۴-HRP در بافر نگهدارنده ، آماده مصرف. (۱ ویال ۱۲ ml).

۳. استانداردها: ۶ استاندارد در غلظتهای ۱۰ ,۵.۰ ,۲.۵ , ۱.۰ , ۰.۵, ۰ براساس ng/dl در بافر حاوی نگهدارنده. (۶ ویال ۰.۵ml).

۴. بافر شستشوی غلیظ: .PBS-Tween (۱ ویال ۳۰ ml)(۲۰X).

۵. محلول سوبسترا- رنگزا: پروکسید هیدروژن و تترا متیل بنزدین در بافر نگهدارنده، آماده مصرف. (۱ ویال ۱۲ ml).

۶. محلول توقف: اسید کلریدریک یک نرمال. (۱ ویال ۶ ml).

۷. سرم کنترل: FT4 در سرم به همراه نگهدارنده. محدوده سرم کنترل بر روی لیبل ذکر شده است. (1 ویال 0.5 ml).

*** محلول شستشو ، رنگزا و توقف در تمام کیتهای شرکت مشترک میباشند.**

* استانداردها و کنترل به صورت آماده مصرف می باشند و نیاز به رقیق سازی ندارند.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

1. سمپلرهای 25 ، 50 و 100 میکرولیتری دقیق
2. آب مقطر
3. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.
4. کاغذ جاذب رطوبت

نگهداری کیت :

1. کیت های باز نشده پس از تحویل باید در دمای 8-2 درجه سانتیگراد (یخچال) نگهداری شوند.
2. میکروپلیت باید در کیسه در بسته به همراه نمگیر نگهداری شود.
3. کیت باید تا تاریخ انقضا استفاده شود (یکسال از زمان تولید). برای اطلاع از تاریخ انقضا به برچسب کیت مراجعه شود.
4. کیت های باز شده اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شوند، حداقل به مدت 3 ماه پایدار خواهند ماند.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

1. سرم نمونه مناسب برای این آزمایش است.
2. از نمونه های با کدورت بالا، همولیز شده و لیپمیک ترجیحا استفاده نشود.
3. برای نگهداری کوتاه مدت نمونه ها، حداکثر به مدت 48 ساعت، باید در دمای 2 تا 8 درجه سانتیگراد نگهداری شوند. برای نگهداری طولانی تر، باید در دمای 20- درجه سانتیگراد قرار گیرند. نمونه های نگهداری شده باید قبل از آزمایش به خوبی مخلوط شوند.
4. از فریز و ذوب مکرر نمونه ها اجتناب شود.

هشدارها

1. کیت فقط برای استفاده در آزمایشگاه تشخیصی کاربرد دارد.
2. از تماس تمام معرف ها به ویژه محلول توقف که حاوی اسید کلریدریک است با پوست جلوگیری شود. در صورت تماس با آب کافی شستشو داده شود.
3. در این کیت برای ساخت برخی اجزا از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر HbsAg، HIV و HCV منفی بوده اند.
4. در محل کار از استعمال دخانیات، نوشیدن و خوردن اجتناب شود. با دهان پی پت نشود. از دستکش و لباس های مناسب استفاده شود.
5. اجزاء کیت ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از تعویض شدن درب معرف ها جلوگیری شود.
6. استفاده از سر سمپلر یکبار مصرف برای دقت و صحت بیشتر توصیه می شود.
7. چاهک ها از نظر وجود حباب بررسی شوند. در صورت وجود حباب با ضربه آهسته به پلیت خارج شوند.

آماده سازی معرف ها:

1. همه معرف ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (27- 22 درجه 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.

نکته های مهم

1. توصیه می شود که بیشتر از 32 چاهک در هر ران کاری استفاده نشود. اگر پی پت به صورت دستی انجام می گیرد، پی پت کردن همه استانداردها، نمونه ها و کنترل باید در 5 دقیقه تمام شود. برای پی پت کردن کل پلیت 96 تستی باید از پی پت اتوماتیک استفاده شود.

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

روش انجام آزمایش:

1- تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را بصورت 2 تایی 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 و نمونه های بیمار را به داخل هر چاهک بریزید.

3- 100 میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی (HRP-FT4) را به تمام چاهک ها اضافه کنید.

4- پلیت را بمدت 15 ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها خوب مخلوط شوند. سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا بمدت 45 دقیقه در دمای اتاق (22-27 درجه سانتیگراد) انکوبه کنید.

5- محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را 5 بار با 350 میکرولیتر بافر شستشوی آماده مصرف بشوئید. 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 در انتهای شستشو، با ضربات ملایم بر روی کاغذ جاذب تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.

6- 100 میکرولیتر از محلول سوبسترای 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 همه چاهک ها اضافه کنید. سپس جذب نور 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). سنجش جذب نوری باید حداکثر تا 15 دقیقه پس از اتمام آزمایش انجام شود.

محاسبه نتایج:

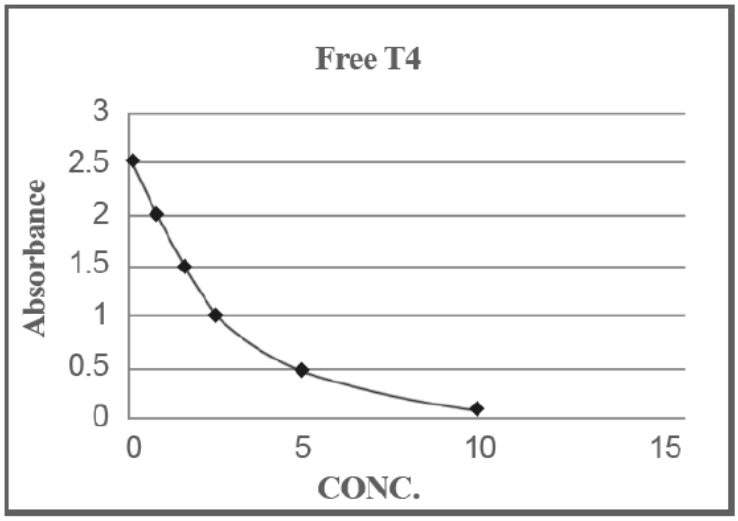
1- با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استانداردی رسم کنید.

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 بعنوان راهنمایی آورده شده است و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید بدست آورد.

ردیف	مقدار استاندارد (ng/dl)	جذب نوری
1	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	0.15



مقادیر طبیعی:

بدلیل اختلافات سنی، نژادی و رژیم تغذیه نمی توان برای تمام جمعیت ها 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 می باشد:

محدوده طبیعی: 0.7 –2.0 ng/dl

خصوصیات کیت

1. حساسیت آنالیتیکال (حد تشخیص) : برای تعیین حد تشخیص 20 مرتبه استاندارد صفر آزمایش شد. حد تشخیص از 2 انحراف معیار (SD) بالاتر از میانگین جذب در غلظت صفر بدست آمد. حد تشخیص برای این کیت 0.2 ng/dl بدست آمد.

2. دقت:

برای محاسبه میزان دقت در یک روز (درون سنجی) و روزهای مختلف (میان سنجی) آزمایش بر روی 3 نمونه سرم چندین 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)
1	20	0.86	0.06	6.9
2	20	1.20	0.07	6.2
3	20	2.20	0.11	4.9

دقت میان سنجی

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/dl)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	10	1.16	0.08	7.1
2	10	1.52	0.06	3.7
3	10	3.28	0.13	3.9

3. ویژگی:

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

نوع ماده	غلظت (µg/ml)	درصد تداخل(٪)
لووتیروکسین		100
لیوتیرونین	2.5	0.33
دی یدوتیرونین	1.4	0.24
سدیم سالی سیلات	10	0.34

4. خطی بودن:

سه نمونه مختلف سرمی با استاندارد صفر به نسبت های 1:2، 1:4 و 1:8 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		
		1:2	1:4	1:8
1	2.27	109	110	107
2	2.04	98	102	108
3	3.54	101	105	104

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; 129: 141-3. 1998
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 87-77 .26-2005.

پاره ای نکات عملی در خصوص رفع مشکلات احتمالی در کیتهای 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	دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید 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	PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید
	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
	طول موج خوانش نامناسب (405 nm بجای 450 nm)	تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید طول موج دستگاه را دوباره چک کنید
صحیح نبودن نمودار استانداردها	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید
	پیپتینگ نامناسب	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 نوک سمپلر نشود
	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید 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	عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید تمام سوزن های 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 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
	پیپتینگ نامناسب، گرفتگی لوله داخلی سمپلر بواسطه آلودگی	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 نوک سمپلر نشود توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد

عدم تکرار پذیری مناسب		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

خلاصه روش آزمایش:

معرف ها	چاهک های مربوط به استانداردها	چاهک های مربوط به نمونه ها
استاندارد ها	25 µl	-
نمونه ها	-	25 µl
کونژوگه	100 µl	100 µl

در دمای اتاق به مدت 45 دقیقه انکوبه نمایید.

5 بار با 350 µl محلول بافر شستشو رقیق شده، شستشو دهید و با دقت محتویات را خالی کنید.

محلول رنگزا	100 µl	100 µl

به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق در تاریکی انکوبه نمایید.

محلول متوقف کننده	50 µl	50 µl

جذب محلول هر چاهک در طول موج 450 nm و فیلتر رفرانس 630 nm قرائت شود.

WWW.PISHGAMANSANJESH.COM
INFO@PISHGAMANSANJESH.COM
JAS-ANZ
TCL ISO 13485
کارخانه : بزرگراه فتح (جاده قدیم کرج)
سه راه شهریار، ابتدای جاده شهریار
شهرک صنعتی گلگون
خیابان هفتم جنوبی، پلاک ۹
تلفن کارخانه: ۰۲۱-۶۵۶۱۱۴۷۸
دفتر مرکزی : تهران، شهرک غرب
بلوار فرحزادی، گلستان سوم
پلاک ۸۶، طبقه اول، واحد ۳
تلفن: ۲-۲۲۰۸۶۵۵۱ ، ۲۶۷۶۰۳۲۳
فکس: ۲۲۰۸۲۵۰۹