

IVD-REF: PS - Free T4	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الایزا Free T ₄
Ver. No: 05		Free T ₄ ELISA KIT

آماده سازی	96 تستی	48 تستی	معرف
آماده مصرف	1×96 wells	1×48 wells	پلیت پوشیده شده با آنتی بادی علیه T4
آماده مصرف	6 ×0.5 mL	6 ×0.5 mL	کالیبراتور 1-6 (0.0, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 و 10 نانوگرم در دسی لیتر) در بافر، به همراه نگهدارنده
آماده مصرف	1 ×0.5 mL	1 ×0.5 mL	نمونه کنترل در بافر سازگار با سرم انسانی همراه با نگهدارنده (بازه قابل قبول سرم کنترل بر روی برجسب قید شده است)
آماده مصرف	1 ×12.0 mL	1 ×6.0 mL	کوئزوگه T4-HRP (قرمز رنگ)
به نسبت 1 به 20 با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید	1 ×30 mL	1 ×30 mL	محلول شستشو غلیظ
آماده مصرف	1 ×12.0 mL	1 ×6.0 mL	محلول سوبسترا-رنگ زا (تترامتیل بنزدین و آب اکسیژنه)
آماده مصرف	1 ×6.0 mL	1 ×6.0 mL	محلول توقف (اسید کلریدریک 1 مولار)

IVD-REF: PS - Free T4	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش تشخیصی و تشخیصی	کیت الایزا T4 Free
Ver. No: 05		Free T4 ELISA KIT

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 (T₄) و تری یدو تیرونین (T₃) توسط غده تیروئید تولید و وارد خون می شوند. فقط 20% هورمون T₃ 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 T₃ در مقایسه با T₄ کمتر است (2 روز در مقایسه با 7 روز) لذا به نظر می رسد تیروکسین عمدتاً به عنوان منبع ذخیره و پیش ساز هورمون T₃ که فعال ترین فرم بیولوژیک هورمون های تیروئیدی است، عمل می کند. قسمت اعظم T₄ و T₃ 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 T₃ در مقایسه با T₄ کمتر است، لذا در مقایسه با تیروکسین، کسر بیشتری از T₃ به شکل آزاد وجود دارد (0.3% از T₃ در مقایسه با 0.02% از T₄). معذالک به دلیل تولید روزانه سه برابری T₄ در مقایسه با T₃، مقدار مطلق T₄ آزاد بیش از T₃ 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 T₃ و T₄ 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 T₄ در پرکاری تیروئید افزایش و در کم 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

IVD-REF: PS - Free T4	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش تشخیصی و تشخیصی و تشخیصی	کیت الایزا Free T ₄
Ver. No: 05		Free T ₄ ELISA KIT

این افراد معمولاً TSH در دامنه مرجع قرار دارد. در مواقع حضور عواملی که باعث تغییر در مقدار یا تمایل پروتئینهای اتصالی به هورمون های تیروئیدی می گردند، و بیماری های غیر تیروئیدی (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 ایستاس بر پایه الیزا نوع رقابتی می باشد. در روش آزمایش، FT₄ موجود در استاندارد یا کنترل یا نمونه بیمار با T₄ کونژوگه با آنزیم HRP برای اتصال و اشغال جایگاه های اختصاصی آنتی بادی ضد T₄ متصل به فاز جامد (چاهک میکروتیتر) به رقابت می پردازند. هرچه مقدار FT₄ 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 مقدار FT₄ موجود در سرم نسبت معکوس دارد.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

1. سمپلهای 25، 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 1 $\mu\text{s}/\text{cm}$
3. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر 450 نانومتری و در صورت امکان 630 نانومتری بعنوان فیلتر فرانس.
4. کاغذ جاذب رطوبت یا رطوبت گیر
5. دستگاه و اشتر 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 2-8 درجه سانتی گراد (یخچال) نگهداری شود. کلیه معرف ها و اجزاء کیت تا تاریخ انقضاء مندرج بر روی جعبه کیت، به شرط نگهداری در دمای یادشده، پایدار هستند. هرگز فراتر از تاریخ انقضاء مندرج بر روی جعبه از کیت استفاده نکنید.
2. غلظت کالیبراتورها و نیز دامنه قابل قبول نمونه 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.

IVD-REF: PS - Free T4	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الایزا Free T4
Ver. No: 05		Free T4 ELISA KIT

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 - 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 FT₄ سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده اند و برای سنجش FT₄ سایر مایعات بیولوژیک یا پلاسمای غیر EDTA مناسب نمی باشد.

IVD-REF: PS - Free T4	 <p>پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی</p>	کیت الایزا T4 آزاد
Ver. No: 05		Free T ₄ ELISA KIT

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 در اجرای آزمایش رعایت شود. برای آگاهی از احتیاطات لازم به "راهنمای اصول کلی حفاظت و پیشگیری از آلودگی کارکنان و محیط آزمایشگاه (روش های صحیح میکروپ شناسی و تکنیک های صحیح آزمایشگاهی)" تألیف 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 با 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 طور کامل ایمنی یک نمونه با منشأ 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 آزاید های فلزی قابل انفجار کند. جهت آگاهی از نحوه وارهایی پس مانده های آزمایشگاهی به "دستورالعمل نحوه مدیریت پسماندهای آزمایشگاهی" تألیف 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 (27-20 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 نمایید.

نکات مهم در انجام تست:

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

IVD-REF: PS - Free T4	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش تشخیصی و تشخیصی	کیت الایزا Free T ₄
Ver. No: 05		Free T ₄ ELISA KIT

2. کیفیت آب مقطر مصرفی در کیفیت محلول شستشو و جدا کردن پیوندهای غیراختصاصی اهمیت زیادی دارد.
 3. در مواردی که مقدار FT₄ نمونه بیش از 10 ng/dL باشد، نمونه را با یک سرم دیگر با محتوای FT₄ پایین رقیق و سپس آزمایش را تکرار نموده و مقدار FT₄ را در نمونه اولیه محاسبه کنید در نظر داشته باشید که در محاسبه مقدار FT₄ نمونه بالا، محتوای FT₄ نمونه ای را که برای رقیق سازی انتخاب کرده اید را نیز مدنظر 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 الایزا 20 تا 27 درجه سانتیگراد می باشد.

6. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.

7. بهتر است 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 مورد استفاده قرار گیرد.

8. جهت پیت کردن محلول سوبستر-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 تیمورسال باشد، با این کیت سازگار نبوده و آزمایش بر روی آنها ممکن است به حصول پاسخ های کاذب بیانجامد.

IVD-REF: PS - Free T4	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الایزا Free T ₄
Ver. No: 05		Free T ₄ ELISA KIT

روش انجام آزمایش:

- 1- تعداد مناسب چاهک های پوشیده شده از آنتی T₄ ، 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 (27°C-20) 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 نمایید.
 - بهتر است برای شستشو از دستگاه های اتوماتیک و اشرفی 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 نمایید.
- 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 نمایید (در صورت امکان از طول موج 630 نانومتر بعنوان فیلتر فرانس استفاده کنید).

محاسبه نتایج:

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

IVD-REF: PS - Free T4	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سیستم‌های تشخیصی و تست‌آوری	کیت الایزا Free T ₄
Ver. No: 05		Free T ₄ ELISA KIT

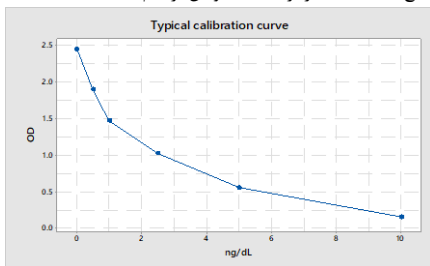
2. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

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 FT₄ 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 بر روی 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

IVD-REF: PS - Free T4	 پیشگامان سنجش پیشگامان در تشخیص‌های تشخیصی و تست‌آوری	کیت الایزا Free T ₄
Ver. No: 05		Free T ₄ ELISA KIT

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 بر روی سرم تعدادی از مراجعه کنندگان چندین آزمایشگاه مختلف در سطح استان تهران به عمل آمد، دامنه مرجع زیر با استفاده از کیت Free T₄ 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 در خصوص جمعیت موردنظر خویش راستی آزمایی (Verification) کرده و در صورت مشاهده ناهمخوانی، بازه مرجع خود را بدست آورد:

0.8-2.0	محدوده طبیعی (ng/dL)
---------	----------------------

یادآوری: در نوزادان نارس و تازه متولد شده، مقادیر فوق افزایش می یابد.

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 95ام (95th percentile) از 60 بار اندازه گیری بر روی نمونه شاهد (استاندارد صفر) طی چندین ران بدست آمد. حد شاهد (LoB) معادل غلطی در نظر گرفته شد که 95٪ از 60 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 FT₄ کمتر از 0.3ng/dL که مقدار FT₄ 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 بالا معادل 0.2 ng/dL تعیین گردید.

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

IVD-REF: PS - Free T4	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش تشخیصی و تشخیصی	کیت الیزا Free T ₄
Ver. No: 05		Free T ₄ ELISA KIT

2- دقت (Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت FT₄ شرکت 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 روز کاری، 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 FT₄ پیشگامان سنجش ایساتیس با سایر ترکیبات مشابه هورمون T₄ 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 FT₄ همزمان در یک ران در نمونه هایی که با ماتریکس بی اثر spike 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 FT₄ اولیه بیان گردید. نتایج در جدولی که در ادامه می آید خلاصه شده است:

IVD-REF: PS - Free T4	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت ایزایز T4 Free
Ver. No: 05		Free T4 ELISA KIT

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

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

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

4- خطی بودن (Linearity):

ارزیابی خطی بودن از طریق رقیق سازی متوالی سه نمونه با محتوای FT₄ مختلف با ماتریکس پروتئینی عاری از FT₄ و مقایسه نتایج حاصل از سنجش FT₄ بر روی نمونه های رقیق شده (Observed value) با نتایج موردانتظار که از ضرب مقدار FT₄ 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)

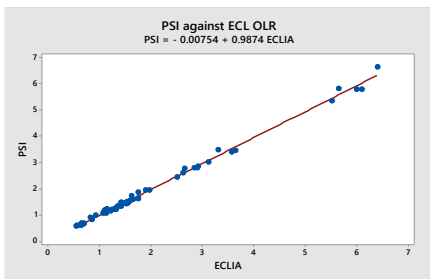
ارزیابی مقایسه ای بین نتایج اندازه گیری کیت سنجش FT₄ سرم شرکت پیشگامان و روش ECLIA-EP 09 Cobas E411-Roche diagnostic (n=60 range:0.5-8.4 ng/dL) انجام و مطابق با راهنمای A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) به روش رگرسیون خطی تحلیل گردید. در این ارزیابی

IVD-REF: PS - Free T4	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تست‌های آوری	کیت الیزا Free T ₄
Ver. No: 05		Free T ₄ ELISA KIT

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

$$\text{PSI} = -0.00754 + 0.9874 \text{ECLIA}$$

$$R\text{-sq} = 0.9957$$



IVD-REF: PS - Free T4	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص‌های و تست‌های آنتی‌بیوتیک	کیت الایزاه T ₄ Free
Ver. No: 05		Free T ₄ ELISA KIT

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.

IVD-REF: PS - Free T4	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تست‌های غربی	کیت الایزا Free T ₄
Ver. No: 05		Free T ₄ ELISA KIT

خطایابی در آزمایش های الایزا

نوع مشکل	علت مشکل	راه حل
<p>پایین بودن OD استانداردها و نمونه ها</p>	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 بیوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.
	طول موج خوانش نامناسب (405 nm بجای 450nm)	1. تست را با دستگاه کالیبره شده بخوانید. 2. طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید.

IVD-REF: PS - Free T4	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تست‌های آنتی‌بادی	کیت الایزا Free T ₄
Ver. No: 05		Free T ₄ ELISA KIT

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

IVD-REF: PS - Free T4	 پیشگامان سنجش پیشگامان در زمینه تشخیص‌های و تست‌های آزمایشگاهی	کیت الایزا Free T4
Ver. No: 05		Free T4 ELISA KIT

تکرار تست با محلول کونزوگه جدید	آلودگی محلول کونزوگه با سدیم آزاید	
<ol style="list-style-type: none"> 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 	پیپتینگ نامناسب، گرفتگی لوله داخلی سمپلر بواسطه آلودگی	عدم تکرار پذیري مناسب
فاصله زمانی بین اضافه کردن استاندارد ها و نمونه نباید بیشتر از 10 دقیقه باشد. در این صورت نتایج قابل اعتماد نیست.	طولانی شدن زمان انجام تست	
پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید.	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	
پیپتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.	باقی ماندن کونزوگه در لبه چاهکها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک ها	
در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک ها نباشد.	وجود حباب در چاهک ها	
کف چاهکها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید.	کثیف بودن کف چاهکها	
قبل از استفاده، ویال محلول ها را به آرامی تکان دهید.	مخلوط نشدن محلول های کیت	

IVD-REF: PS - Free T4	 <p>پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص‌های و تست‌های آنتی</p>	کیت الایزا Free T ₄
Ver. No: 05		Free T ₄ ELISA KIT