

Free T4

موارد استفاده:
تعیین کمی Free T4 در سرم یا پلاسمای

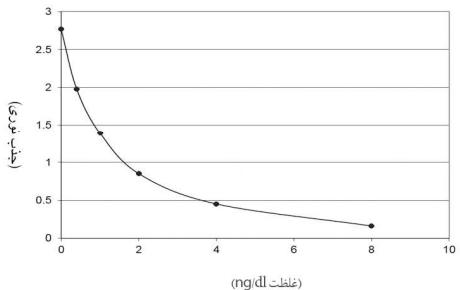
I. مقدمه:

VII. محاسبه نتایج:

پس از تعیین میزان جذب نوری استانداردها و نمونه ها و ترسیم منحنی، مقدار Free T4 بیماران را می توان محاسبه کرد. در منحنی مذکور که با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (قابل برنامه ریزی) و با به صورت دستی ترسیم می شود، معور Y شاخص میزان جذب نوری استانداردها در طول موج ۴۵۰ نانومتر و معور X شاخص غلظت استانداردهای Free T4 بر حسب ng/dl است. نتایجی که در جدول زیر آمده فقط مثال هستند و نایاب برای تفسیر نتایج از آنها استفاده شود.

| نمونه | غلهای | Free T4 (ng/dl) | جذب نور |
|-------|----------|-----------------|---------|
| A | کالبیروت | ۰/۷ | ۲/۷۷ |
| B | کالبیروت | ۰/۹۸ | ۱/۹ |
| C | کالبیروت | ۱/۳۹ | ۱/۱ |
| D | کالبیروت | ۰/۸۵ | ۲/۰ |
| E | کالبیروت | ۰/۴۵ | ۴/۰ |
| F | کالبیروت | ۰/۱۶ | ۸/۰ |
| سرم | | ۰/۴۵ | ۲/۹ |

برای ترسیم منحنی از ارزش های مندرج بر روی ویال استانداردها استفاده کنید.



V. نحوه جمع آوری و آماده سازی نمونه ها:

نمونه مناسب جهت اندازه گیری Free T4 سرم یا پلاسمای هیارینه بیمار است. این نمونه ها یک هفته در دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد قابل نگهداری است. برای نگهداری نمونه ها به مدت طولانیتر سرم یا پلاسمای بیمار را در حجم های کم تقسیم نموده و در ۲-۰ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید. بهتر است از ذوب شدن و بخ زدن مکرر نمونه ها اجتناب نمود. برای اندازه گیری Free T4 نمونه های منجمد شده، ابتدا نمونه را در حرارت اتاق ذوب و سپس با حرکت دست یکنواخت نمایید.

برای یکنواخت کردن نمونه ها از Vortex استفاده ننمایید.

برای اندازه گیری دقیق نمونه هایی که میزان Free T4 آنها بیش از آخرین استاندارد است، ابتدا نمونه ها را با استاندارد صفر رقیق کرده، سپس اندازه گیری مجدد بعمل آورید. بدینهی است در محاسبه نتایج این نمونه ها، ضریب رقت منظور می شود.

VI. روش کار:

قبل از شروع کار باید دمای تمامی محلولها به دمای اتاق برسد.

یک حجم از محلول شستشوی غلیظ را با ۱۹ حجم آب مقطر یا دیونیزه رقیق نمایید. این محلول به مدت یک هفته در دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد باید از در صورت مشاهده کریستال در محلول غلیظ شستشو، ویال را به مدت چند دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد فرار دهید تا محلول یکنواخت گردد.

۱. ابتدا ۲۵ میکرولیتر از استانداردها، سرم کنترل ها و نمونه های سرم بیماران را در داخل خفره ها ریخته، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از دیداب آنژیمی T4-HRP را به خفره های مربوطه اضافه نمایید. سپس با تکان دادن پلیت، محظیات خفره ها را به مدت ۱۵ ثانیه محلول نمایید.

۲. پلیت را با برجسب مخصوص پوشانده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق فرار دهید.

۳. پلیت را ۴ بار با ۲۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.

۴. به هر خفره ۱۰۰ میکرو لیتر سوبسترای TMB اضافه کنید.

۵. پلیت را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و در محلی تاریک فرار دهید.

۶. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش در هر خفره ریخته و به مدت ۱۰ ثانیه محلول کنید.

۷. میزان جذب نوری خفره ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با طول موج دیفارسیل ۶۳۰ نانومتر) حداقل تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، پخوانید.

III. محتویات کیت:

محلولهای این کیت (Cat.No.P-FT4I) جهت انجام ۹۶ تست بوده و تاریخ انقضای هر یک بر روی شیشه آن درج شده است. دمای مناسب برای نگهداری کیت ۲-۸ درجه سانتی گراد می باشد.

۱. پلیت: پلیت ۹۶ حفره ای پوشش داده شده با آنتی بادی منو کلونال ضد T4 موش.

۲. استانداردها: ۶ ویال ۱ میلی لیتری استاندارد حاوی T4، سرم انسانی و تیمورزال. غلظت های دقیق استانداردها (بر حسب ng/dL) بر روی برجسب و بالهای درج شده است.

۳. کنترل های سرمی: ۲ ویال ۱ میلی لیتری سرم کنترل حاوی T4. سرم انسانی و تیمورزال. غلظت های دقیق Free T4 کنترل های سرمی (بر حسب ng/dL) بر روی برجسب و بالهای درج شده است.

۴. ریداب آنژیمی: یک ویال ۱۲ میلی لیتری T4 متصل به پراکسیداز (HRP) محلول در بافر PBS، حاوی پروتئین و تیمورزال.

۵. محلول شستشوی غلیظ (۲۰X): یک ویال ۱۲ میلی لیتری محلول حاوی ۲۰ PBS_Tween و تیمورزال.

۶. محلول رنگ زا: یک ویال ۱۲ میلی لیتری بافر H_2O_2 و TMB.

۷. محلول متوقف کننده واکنش: یک ویال ۱۲ میلی لیتری H_2SO_4 دو نرمال.

IV. وسایل مورد نیاز (این وسایل همراه کیت عرضه نمی شوند):

۱. دستگاه اسیکترو فوتومتر میکروولیت با دامنه جذب نوری ۰-۳۰ در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دیفارسیل ۶۳۰ نانومتر.
۲. میکروپیپت قابل تنظیم بر روی ۲۵ تا ۱۰۰ میکرولیتر و تیپ های یکبار مصرف.
۳. آب مقطر یا آب دیونیزه برای رقیق کردن محلول شستشو.

II. اصول اندازه گیری:

کیت اندازه گیری کیت Free T4 بر مبنای سنجش واکنش رقابتی ایمونو آنژیماتیک روی فاز جامد طراحی شده است. در این سیستم، نمونه بیمار و مقدار ثابتی از T4 متصل به آنزیم پراکسیداز (HRP) به خفره های پلی استینون پوشیده شده آنتی بادی منو کلونال ضد T4 افزوده می شود. درین انکوباسیون Free T4 موجود در سرم بیمار با T4-HRP برای تشکیل پیوند با آنتی بادی های ضد T4 وارد رقابت می شود. در نتیجه مقارن HRP-T4 متصل به میزان Ab-T4 با میزان T4-HRP موجود در سرم سنجش مکوس دارد. پس از انکوباسیون مقایر اضافی خارج می شود. سپس افزودن سوسٹرای TMB (۲'۰ و ۵'۰ تراکت) ترتامیل بنیدین، سبب ایجاد رنگ آبی توسعه آنژیمی می شود. رنگ زالی واکنش آنژیماتیک با افزودن محلول متوقف کننده، خانمه یافته و رنگ آبی ایجاد شده به رنگ زرد تبدیل می شود. شدت رنگ ایجاد شده به وسیله یک اسپکترو فوتومتر مخصوص میکروپیپت در طول موج ۴۵۰ نانومتر ارزش اندازه گیری می شود. برای تعیین غلظت نمونه ها ابتدا منحنی جذب نوری استاندارد تعیین می شود. سپس این غلظت نمونه ها از روی منحنی استاندارد تعیین می شود. شدت رنگ ایجاد شده با غلظت Free T4 موجود در نمونه ها نسبت مکوس دارد.

VIII. مقداری طبیعی:

جهت تعیین مقداری طبیعی Free T4 غلظت این هورمون در ۳۲۱ سرم بdest آمده از افراد بالغ سالم و نیز ۲۱۲ سرم زن باردار اندازه گیری گردید. نتایج بدست آمده از این بررسی در جدول زیر آمده است :

| تعداد | دامنه طبیعی | انحراف معیار (SD) | میانگین (X) | (n) | درون سننجی (ng/dl) |
|---------|-------------|-------------------|-------------|-----|--------------------|
| ۰/۹-۱/۷ | ۰/۴ | ۱/۳ | ۳۲۱ | ۰/۶ | افراد بالغ سالم |
| ۱/۰-۱/۸ | ۰/۴ | ۱/۴ | ۲۱۲ | ۳/۴ | زنان باردار |

توصیه می گردد هر آزمایشگاه با در نظر گرفتن غلظت سرمی Free T4 افراد سالم، دامنه طبیعی آن را تعیین نموده و از آن به عنوان مبنای مقایسه خود استفاده نماید.

IX. پیویگی های اختصاصی تست:

۱. حساسیت : به حداقل غلظت Free T4 که اختلاف جذب نوری آن نسبت به جذب نوری استاندارد صفر، معنی دار باشد حساسیت کیت گفته می شود. این مقدار برای کیت Free T4 ۰/۱ ng/dl است.

۲. اثر Hook: در کیت Free T4 پادتن علم برای محلولهای ریکاوری شده حاوی T4 ناگلطف ۵۰۰ ng/dl اثر Hook مشاهده شده است.

۳. مقایسه با روش الکترو کمی لومینسانس Free T4 : برای بررسی همبستگی آماری بین کیت EIA پادتن علم و کیت Free T4 ۳۷۷ نمونه تصادفی با هر دو کیت اندازه گیری شد. مقایسه نتایج به دست آمده، ضریب همبستگی ۰/۹۷ را نشان می دهد.

۴. اختصاصی بودن کیت پادتن علم: اختصاصی بودن کیت Free T4 شرکت پادتن علم در جدول زیر مورد بررسی قرار گرفت. درصد تداخل برای هر یک از آنالیت ها محاسبه گردید. درصد تداخل برای این مواد کمتر از ۰/۰ است. با توجه به اینکه حساسیت این کیت ۱/۱ ng/dl می باشد، نتایج حاکی از اختصاصی بودن آنتی بادی مونو کلناں ضد T4 بکار رفته در پوشش حفره های پلیت در کیت متوجه Free T4 می باشد.

| درصد تداخل | ماهی افزوده شده |
|------------|------------------------|
| ۱۰۰ | D-Triiodo Thyronine |
| <۰/۱ | 3,5-Diiodo-L-thyronine |
| <۰/۱ | Diiodo Thyrosine |
| <۰/۱ | Mono Iodo Thyrosine |

۵. دقت: شاخص دقت کیت با مقایسه تک رازدیزی (Inter-assay) جواب ها به روش میان سننجی (Intra-assay) و درون سننجی (Inter-assay) تعیین شده است. برای این مظاوم ۳ نمونه سرم ۱۰ بار در یک دوره آزمایش (درون سننجی) و بکار در ۱۰ دوره آزمایش متوالی (میان سننجی) تعیین غلظت شده است. نتایج انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات (CV) در جدول آمده است.

جدول شاخص دقت

| میان سننجی | | درون سننجی | |
|-----------------|-----|-----------------|-----|
| میانگین (ng/dl) | SD | میانگین (ng/dl) | SD |
| ۱ | ۲/۰ | ۰/۱۳ | ۶/۴ |
| ۲ | ۲/۷ | ۰/۱۶ | ۴/۲ |
| ۳ | ۶/۱ | ۰/۲۰ | ۳/۲ |

۶. ریکاوری و رقت: ریکاوری به حالتی اطلاق می شود که با افزودن حجم معینی از یک محلول با غلظت بالا به نمونه رفق تر، افزایش غلظت حاصل شود . برای تعیین ریکاوری، محلولی با غلظت بالای Free T4 به نمونه سرمی که غلظت پائینی از Free T4 دارد، افزوده شده است . درصد ریکاوری فرمول زیر محاسبه می شود :

$$\frac{\text{غلظت اندازه گیری شده}}{\text{غلظت پیش بینی شده}} \times 100$$

دامنه درصد ریکاوری به دست آمده از ۹۶/۰ تا ۱۰۴/۲ است.

جدول ریکاوری

| ریکاوری % | غلظت اندازه گیری شده (ng/dl) | غلظت پیش بینی شده (ng/dl) | حجم افزوده شده μl |
|-----------|------------------------------|---------------------------|-------------------|
| - | - | ۷/۲ | - |
| ۲۵ | ۱/۶۸ | ۱/۷۵ | ۱۰۴/۲ |
| ۵۰ | ۲/۶ | ۲/۵۵ | ۹۸/۱ |
| ۱۰۰ | ۳/۷۵ | ۳/۶ | ۹۶/۰ |
| ۲۰۰ | ۴/۹ | ۴/۸۵ | ۹۹/۰ |

برای بررسی خطی بودن نتایج کیت Free T4 شرکت پادتن علم چندین نمونه سرمی غلظت، پس از رقت شدن متواലی با نمونه در حد صفر، اندازه گیری شده و نتایج یک نمونه برای مثال در جدول زیر آورده شده است . دامنه درصد ریکاوری به دست آمده از ۹۷/۸ تا ۱۰۲/۷ است.

جدول رقت

| رقت | ریکاوری % | غلظت اندازه گیری شده (ng/dl) | غلظت پیش بینی شده (ng/dl) |
|-----|-----------|------------------------------|---------------------------|
| - | - | ۲/۸۵ | - |
| ۱:۲ | ۱/۸۵ | ۱/۹ | ۱۰۲/۷ |
| ۱:۴ | ۰/۹۲ | ۰/۹ | ۹۷/۸ |
| ۱:۸ | ۰/۴۶ | ۰/۴۵ | ۹۷/۸ |

احیاطا!

با توجه به اینکه محلول های به کار رفته در این کیت ها حاوی مواد سمنی تیمورزال و مواد پروتئینی با منشا انسانی و حیوانی هستند، و اینکه با هیچ تستی نمی توان از عدم وجود ویروس هایی چون HIV، HBV، HCV در این محلول ها اطمینان کامل حاصل کرد، خواهشمند است هنگام کار اختیاط های لازم از جمله استفاده از دستکش، امتناع از خوردن و آشامیدن و سیگار کشیدن، خودداری از پیش کردن با دهان و پرهیز از هرگونه تماس محلول با چشم و دست ها، رعایت شود.