معرف	48 تستی	96 تستی	آماده سازی
پلیت پوشیده شده با آنتی بادی علیه T4	1×48 wells	1×96 wells	آماده مصرف
کالیبراتور 1-4(غلظت کالیبراتورها برروی ویال قید شده و بین شناسه های ساخت مختلف تفاوت دارد)در بافر، به همراه نگهدارنده	4 ×0.5 mL	4 ×0.5 mL	آماده مصرف
نمونهٔ کنترل در بافر سازگار با سرم انسانی همراه با نگهدارنده(بازه قابل قبول سرم کنترل برروی برچسب قید شده است)	1 ×0.5 mL	1 ×0.5 mL	آماده مصرف
کونژوگه T4-HRP(قرمز رنگ)	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول شستشو غلیظ	1 ×30 mL	1 ×30 mL	به نسبت 1 به 20 با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید
محلول سوبسترا-رنگ زا(تترامتیل بنزدین و آب اکسیژنه)	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول توقف (اسید کلریدریک 1 مولار)	1 ×6.0 mL	1 ×6.0 mL	آماده مصرف

کاربرد:

کیت **T-uptake** شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس برای اندازه گیری میزان برداشت هورمونهای تیروئیدی توسط پروتئین های سرم طراحی گردیده است.

مقدمه :

دو هورمون تیروکسین (T_4) و تری یدوتیرونین(T_3) توسط غده تیروئید تولید و وارد خون می شوند. قسمت اعظم T_4 و T_3 موجود در خون به صورت متصل به پروتئین های **TBG**، ترانس تیرتین (که قبلاً پره آلبومین نامیده می شد) و آلبومین منتقل می شود اما تمایل **TBG** به T_3 در مقایسه با T_4 کمتر است، لذا در مقایسه با تیروکسین، کسر بیشتری از T_3 به شکل آزاد وجود دارد(**0.3%** ازT_3 در مقایسه با **0.02%** از T_4). معذالک به دلیل تولید روزانه سه برابری T_4 در مقایسه با T_3، مقدار مطلق T_4 آزاد بیش از T_3 آزاد است. بخش فعال بیولوژیک هورمون های تیروئیدی بخش آزاد این هورمون هاست.

برخی عوامل نظیر حاملگی یا مصرف قرص های ضدبارداری خوراکی باعث افزایش غلظت پروتئینهای اتصالی هورمون های تیروئیدی گشته و غده تیروئید طی یک سازوکار جبرانی در این موارد تولید هورمون های تیروئیدی را افزایش داده تا مقدار هورمون آزاد در بازه ثابت موردنیاز برای فعالیت های حیاتی بدن باقی بماند. در این مواقع غلظت هورمون های تام تیروئیدی افزایش یافته، بدون اینکه علائمی دال بر وجود پرکاری تیروئید یا تغییر در غلظت **TSH** حاصل شود. آزمایش سنجش میزان برداشت هورمون های تیروئیدی یا **T-uptake** به نوعی اندازه گیری غیرمستقیم جایگاه های اشغال نشده پروتئینهای اتصالی پلاسماست و با این هدف طراحی شده است. متعاقب اندازه گیری **T-uptake** شاخص تیروکسین آزاد(**Free Thyroxine Index or FTI**) از رابطه زیر بدست می آید:

$$FTI = \frac{Patient\ T-uptake}{reference\ T-uptake} \times patient\ Total\ T_4$$

در این رابطه **reference T-uptake** مقدار **T-uptake** شاخص آزمایشگاه می باشد، که از میانگین گرفتن نتایج **T-uptake** افراد طبیعی بدست می آید. با توجه به بازه مرجع **T-uptake** این مقدار در این رابطه اغلب معادل 30 درنظر گرفته می شود.

در پرکاری تیروئید و کم کاری تیروئید مقدار **T-uptake** و تیروکسین به موازات یکدیگر به ترتیب افزایش یا کاهش می یابد ، اما در ناهنجاری های پروتئینهای اتصالی مقدار این دو در جهت عکس یکدیگر تغییر می یابد و

بدنبال افزایش **T-uptake** مقدار تیروکسین تام کاهش می یابد، یا با کاهش مقدار **T-uptake** مقدار تیروکسین تام افزایش می یابد. به عنوان مثال در حاملگی یا مصرف قرص های ضدبارداری خوراکی، افزایش مقدار تیروکسین تام با کاهش مقدار **T-uptake** همراه است.

اساس آزمایش :

مبنای کیت سنجشT-uptake شرکت تولیدی-تحقیقاتی پیشگامان سنجش ایساتیس بر پایه الایزا رقابتی می باشد. در این کیت ابتدا تیروکسین آزاد و کونژوگه T_4-HRP به همراه سرم بیمار به عنوان منبع پروتئینهای اتصالی به چاهک های میکروتیتر پوشیده شده از آنتی بادی علیه T_4 اضافه می شوند. در ادامه تیروکسین آزاد ،به پروتئینهای اتصالی موجود در سرم بیمار متصل می شود اما این اتصال بین T_4-HRP و پروتئینها رخ نمی دهد.

$$\boldsymbol{T_4 + P \rightleftarrows T_4 - P} \quad \textbf{(1)}$$

تیروکسین افزوده شده، که در واکنش 1 مصرف نشده است، با T_4-HRP در اشغال جایگاه های خالی آنتیT_4 موجود بر فازجامد به رقابت می پردازند. واکنش را می توان به کمک معادله زیر نشان داد:

$$HRPT_4 + T_4 + Ab_{sp} \rightleftharpoons HRPT_4Ab_{sp} + T_4Ab_{sp} \quad (2)$$

در این رابطه T_4 تیروکسین مصرف نشده در واکنش(1) و Ab_{sp} آنتی بادی فاز جامد می باشد. بعد از رسیدن به نقطه تعادل طی شستشو اجزاء اتصال نایافته از اجزاء اتصال یافته جدا می شوند. هر چه ظرفیت اتصال سرم بیشتر باشد، T_4 بیشتری در واکنش(1) مصرف شده و T_4Ab_{sp} کمتری در واکنش(2) تولید شده و مجموعه $HRPT_4Ab_{sp}$ بیشتر بوده و رنگ بیشتری تولید می کند(کم کاری تیروئید). برعکس در موارد کاهش ظرفیت اتصال T_4 کمتری مصرف شده و مقدار $HRPT_4Ab_{sp}$ کمتری بوده و در نتیجه مقدار کمتری رنگ تولید می شود (پرکاری تیروئید).

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

1. سمپلرهای25، 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 **1µs/cm**
3. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر 450 نانومتری و در صورت امکان 630 نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.
4. کاغذ جاذب رطوبت

5. دستگاه واشر 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 8-2 درجه سانتی گراد (یخچال) نگهداری شود. کلیه معرف ها و اجزاء کیت تا تاریخ انقضاء مندرج برروی جعبه کیت، به شرط نگهداری در دمای یادشده، پایدار هستند. ***هرگز فراتر از تاریخ انقضاء مندرج برروی جعبه از کیت استفاده نکنید.***
2. غلظت کالیبراتورها و نیز دامنه قابل قبول نمونهٔ 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.
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**- سانتیگراد 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 مستقیمT-uptake سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده اند و برای سنجش T-uptake در سایر مایعات بیولوژیک یا پلاسمای غیر EDTA مناسب نمی باشد.
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 دراجرای آزمایش رعایت شود. برای آگاهی از احتیاطات لازم به "راهنمای اصول کلی حفاظت و پیشگیری از آلودگی کارکنان و محیط آزمایشگاه (روش های صحیح میکروب شناسی وتکنیک های صحیح آزمایشگاهی)" تالیف 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 به ویژه محلول توقف که حاوی اسید کلریدریک 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 طورکامل ایمنی یک نمونه با منشاء 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 آزایدهای فلزی قابل انفجار کند. جهت آگاهی از نحوه وارهایی پس ماندهای آزمایشگاهی به "دستورالعمل نحوه مدیریت پسماندهای آزمایشگاهی" تالیف 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 (27-20درجه 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.

نکات مهم در انجام تست:

1. فرایند شستشو از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. شستشوی ناکافی باعث عدم جداشدن پیوندهای غیراختصاصی و جذب نوری زمینه (Background) می گردد.
2. کیفیت آب مقطر مصرفی در کیفیت محلول شستشو و جدا کردن پیوندهای غیراختصاصی اهمیت زیادی دارد.
3. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.
4. دمای مطلوب محیط آزمایشگاه برای آزمایش های الایزا20 تا27 درجه سانتیگراد می باشد.
5. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.
6. بهتراست 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 مورداستفاده قرار گیرد.
7. جهت پیپت کردن محلول سوبسترا-رنگ زا و محلول توقف از میکروپیپت های حاوی ***قطعات فلزی استفاده نکنید***.
8. زمان های انکوباسیون و دمای انکوباسیون را با دقت رعایت کنید.
9. 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.
10. در هر بار انجام آزمایش منحنی کالیبراسیون را مجدد ترسیم نموده و برای محاسبه نتایج از منحنی ذخیره شده استفاده نکنید.
11. مراحل آزمایش را بدون وقفه انجام دهید. وقفه بین مراحل باعث نتایج کاذب می گردد.

12. 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.

13. هر نوع نمونه یا ماده کنترلی که حاوی سدیم آزاید یا تیومرسال باشد، با این کیت سازگار نبوده و آزمایش برروی آنها ممکن است به حصول پاسخ های کاذب بیانجامد.

روش انجام آزمایش:

1- تعداد مناسب چاهک های پوشیده شده از آنتی T_4 ، 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** حاوی تیروکسین آزاد به تمام چاهک ها اضافه کنید.

4- پلیت را به مدت 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 به مدت 45 دقیقه در دمای اتاق(**20-27°C**) 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 الرطوبه تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.
- بهتراست برای شستشو از دستگاه های اتوماتیک واشر 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 به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

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 نمائید (در صورت امکان از طول موج 630 نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید).

محاسبه نتایج:

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

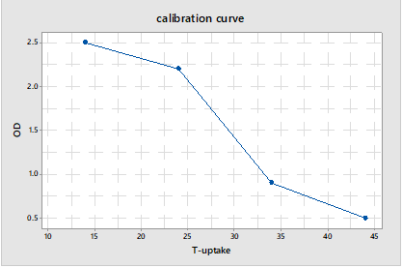
2. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور **Y** جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور **X** وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

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 **%T-uptake** نمونه بیمار 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	OD	T-uptake
1	2.5	14
2	2.2	24
3	0.9	34
4	0.5	44



کنترل کیفی:

در هر کیت یک نمونه کنترل وجود دارد که مقادیر موردانتظار برای آن برروی 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 **T-uptake** 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 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 برروی سرم تعدادی از مراجعه کنندگان چندین آزمایشگاه مختلف در سطح استان تهران به عمل آمد ، دامنه مرجع زیر برای گروه های مختلف سنی و جنسی براساس درون یابی دامنه بین ٪2/5 و ٪97/5 مرکزی با استفاده از کیت**T-uptake** 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 درخصوص جمعیت موردنظر خویش راستی آزمایی(**Verification**) کرده و درصورت مشاهده ناهمخوانی، بازه مرجع خود را بدست آورد:

Analyte	Number	Mean (%)	2.5th percentile (%)	97.5 percentile (%)
T-uptake	137	30	25	35
FTI	-		5.4	9.7

2- دقت(Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت **T-uptake** شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس و 3 انباشته سرمی تهیه شده از نمونه های بیمار، مطابق با راهنمای **EP 05-A3** مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(**CLSI**) بدست آمد.

طی 10 روزکاری، 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 (%)	Repeatability		Within-Laboratory Precision	
		SD	%CV	SD	%CV
Patient Pool	22.4	1.9	8.48	1.8	8.04
Patient Pool	33.1	2.9	8.76	1.92	5.80
Patient Pool	43.2	2.11	4.88	2.73	6.32

3- اختصاصیت(Specificity):

ارزیابی اختصاصیت مطابق با راهنمای **EP 07-A2** مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(**CLSI**)، جهت تعیین درصد تداخل از جانب مداخله گرهای متداول بیوشیمیایی همولیز، ایکتر و هایپر لیپیدمی انجام و مشخص گردید که هموگلوبین تا **50 mg/mL**، بیلیروبین غیرکونژوگه تا **20 mg/dL** و تری گلیسریدهای سرم تا **1000 mg/mL** تأثیری بر سنجش **T-uptake** سرم با کیت پیشگامان سنجش ندارد(**%interference≤10%**)

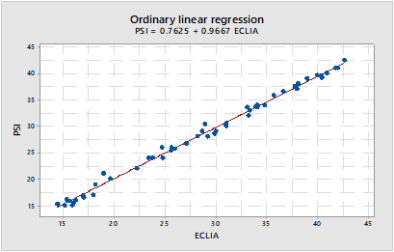
4- درستی(Trueness):

ارزیابی مقایسه ای(Method comparison)

ارزیابی مقایسه ای بین نتایج اندازه گیری کیت سنجش **T-uptake** سرم شرکت پیشگامان و روش Elecsis T-uptake Cobas E411-Roche diagnostic (n=52 range:14-43) انجام و مطابق با راهنمای **EP 09-A2** مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(**CLSI**) به روش رگرسیون خطی تحلیل گردید. خلاصه نتایج و نمودار رگرسیون خطی(**Linear regression**) در ادامه آورده شده است:

$$PSI = 0.7625 + 0.9667ECLIA$$

$$PSI = 0.7625 + 0.9667ECLIA$$



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. Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias derived from intra- and inter-individual biologic variation, https://www.westgard.com/biodatabase1.htm

5. Kasper D.L. et al. (2018). Harrison's principles of internal medicine.20th ed.(pp. 6608-12) Mc Graw Hill Education

6. Pagana K.D. et al. (2018). Mosby's Manual of diagnostic and Laboratory tests.6th ed. Elsevier Inc.

7. Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics. (pp. 1578-80). 6th ed. Elsevier Inc.

خطایابی در آزمایش های 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	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 بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.
	طول موج خوانش نامناسب (405 nm بجای 450nm)	1.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. 2.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
صحیح نبودن نمودار استانداردها	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید.
	پیپتینگ نامناسب	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 نوک سمپلر نشود.
	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.
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	1.عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. 2. تمام سوزن های دستگاه واشر را چک کنید.
	طول موج نامناسب در خوانش	1.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. 2.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. 3.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

عدم تکرار پذیری مناسب	پیپتینگ نامناسب، گرفتگی لوله داخلی سمپلر بواسطه آلودگی	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
	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.

INTENDED USE:

The Quantitative Determination total amount of Binding Sites Available for the Thyroid hormones in human serum or EDTA plasma

CLINICAL SIGNIFICANCE:

The thyroid hormone thyroxine (T4) is one of the thyroid hormones which plays role in general metabolism. The measurement of the T4 concentration is of importance in laboratory diagnostics for differential diagnosis between euthyroid, hyperthyroid, and hypothyroid conditions. As the major fraction of the total thyroxine is bound to transport proteins (TBG, transthyretin or prealbumin, and albumin), the measurement of thyroxine only provides correct information about total thyroxine. Any alteration in thyroid binding proteins specially TBG can affect total thyroxine, while the amount of free T4 which is physiologically active form of hormone, remains constant. A change in the TBG concentration can lead to elevated or lowered total T4 concentrations being measured although the free T4 concentration is in the euthyroid range. A T-uptake result provides useful information about serum thyroid binding capacity and therefore free thyroid index (FTI). In hyperthyroidism or hypothyroidism both T4 and T-up elevate or decrease, but in conditions in which there is a binding globulin abnormality, these two values diverge (e. g. in pregnancy or estrogen therapy total T4 increase while T-uptake decrease).

Measurement Principle:

First specified amount of thyroxine and HRP-T4 conjugate and patient serum as a source of binding proteins(P) are mixed with monoclonal antibody against T4(Ab) immobilized on microtiter plate. following mixing the enzyme-conjugate and thyroxine with the specimen, a binding reaction results between the patient's binding proteins and the added thyroxine but not with the enzyme conjugate.

this interaction is represented below:

$T_4 + P \rightleftharpoons T_4$-P (1)

The added T4 not consumed in reaction (1) compete with T4-HRP for limited site on immobilized solid phase antibody. The reaction can be explained by following equation:

$HRPT_4 + T_4 + Ab_{sp} \rightleftharpoons HRPT_4Ab_{sp} + T_4Ab_{sp}$ (2)

In this equation T_4 is unreacted thyroxine in reaction(1)and Ab_{sp} is solid phase immobilized antibody. After equilibrium is attained, bound fraction separated from unbound HRPT_4 by washing. Whatever the binding capacity of patient serum is greater, more T4 consumed in reaction (1), less T_4Ab_{sp} formed in reaction (2) and therefore more $HRPT_4Ab_{sp}$ complexes produce more color (hypothyroidism). On the contrary, less binding capacity (Hyperthyroidism), less T4 consumed, and less HRPT_4 complexes produced and therefore less color is developed.

Reagent and material supplied in the kit:

Reagent	Quantity/96 Test KIT	Reconstitution
Microplate (96 breakable wells) coated with anti T4	96 wells	Ready to Use
Calibrators A-D (Exact T-uptake percentage printed on the label) in buffer, containing preservative	6 Vial/0.5ml	Ready to Use
Controls N = 1 in buffer compatible with human serum matrix with preservatives	1 Vial/0.5 ml	Ready to Use
Enzyme Conjugate (red color)	1 Vial/12 ml	Ready to use
Concentrated Wash solution	1 Vial/30 ml	Dilute 20X with distilled water
Substrate-Chromogenic solution (Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide)	1 Vial/12ml	Ready to Use
Stop solution (H2So4 0.12M) Additional information about other additive is considered proprietary.	1 Vial/6.0 ml	Ready to Use

Materials required but not supplied with kit

The following materials are required but not provided in the kit:

- Distilled water with conductivity < 1µS/cm
- Precise micropipettes for delivery of 25, 50, 100, microliters. An 8-channel pipette or respenser pipette with disposable plastic tips for delivery of 25-100 µL is useful but not essential.
- Pipettes for dispensing milliliter volumes.
- Vortex mixer
- Automatic washer or any other device which can deliver 350 microliter wash solution for microplates
- Microplate reader with a wavelength of 450 nm and 620-650 nm, and an absorbance range of 0-3.0

STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- If kept at 2-8 °C, before opening or reconstitution, all kit components are stable until the expiry date as indicated on their label.
- Calibrators concentration is displayed on the vial labels and may vary between lots.
- Do not freeze kit components.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the preparation day.
- Each lot of reagents and calibrators has been standardized to produce the correct reaction. Do not interchange the reagents or calibrators between lots.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration. Chromogenic solution TMB should be colorless. Blue color indicates that the reagent has been contaminated and should be discarded.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Human serum and EDTA plasma are samples of choice for PSI T-uptake EIA kit.
- Do not use grossly haemolysed or turbid samples.

- If the measurement cannot be done within 24 hours after sample collection, samples should be kept at 2-8°C up to 48 hours. For longer storage serum or plasma must be stored at -20°C.
- Avoid repeated freeze and thaw cycles. Frozen specimens must be gently but thoroughly mixed after thawing.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

- For Professional in vitro diagnostic use only.
- All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of T-Uptake in human serum. The kit is not calibrated for the determination of T-uptake in Non-EDTA plasma or other specimens of human or animal origin.
- Before starting the assay, read the working manual completely and carefully. Use the valid version of the instruction provided with the kit. Be sure that everything is understood.
- Please refer to the U.S. Department of Health and Human Services (Bethesda, Md., USA) publication No (CDC) 88—8_95 on laboratory safety procedures or any other local or national regulation.
- Handle all patient specimens as potentially infectious.
- Reagents contain sodium azide (NaN3) as a preservative. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. Follow local guidelines for disposal of all waste material.
- Avoid any skin contact with all reagents. Stop solution contains strong acid in case of contact, wash thoroughly with soap and water.

Caution

Material used in the preparation of human source reagents has been tested and found to be non-reactive for HIV 1 & 2 antibodies, HCV antibody and hepatitis B Surface Antigen (HBsAg). Since no method can completely rule out the presence of blood borne diseases, the handling and disposal of human source reagents from this product should be made as if they are potentially infectious.

Preparation of reagents

Wash Buffer:

According to the required volume, pour the desired volume of wash concentrate into a clean container and dilute 20 fold by adding adequate volume of distilled or deionized water to gain buffered Wash Solution. E.g., 10 mL wash concentrate to 190 mL distilled water. Wash solution should be prepared daily and discard unused working wash solution at the end of the day.

HANDELING NOTES

- Do not use the kit or components beyond the expiry date.
- Do not mix up vial caps.

- Bring all the reagents to room temperature prior to use.
- Thoroughly mix all reagents, calibrators/controls and samples by gentle agitation or swirling.
- Assay calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
- Use a clean container and high quality distilled or deionized water to prepare the working wash solution.
- In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for addition of each reagent and sample.
- For the dispensing of Chromogenic solution and Stop solution, avoid pipettes with metal parts.
- High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
- Adhere the incubation times carefully. Tolerance limit of incubation time is ±5%

1. To avoid drift, arising from low volume sample evaporation or incubation time difference between first and last well, it is strongly recommended not to run more than six strips when pipetting manually (Time delay).
2. Perform all steps consecutively without any delay. Any delay in each step has deleterious effects on final results.
3. Draw a calibration curve for each run, do not use stored curve from previous runs.
4. Incubation with Chromogenic solution must be done in the dark.
5. Opened reagents are stable maximally for 8 weeks if they are not contaminated, and stored in resealed original containers and handled as prescribed. Return to 2-8°C immediately after use.

Measuring Procedure

1. Transfer the required number of microplate strips to a strip frame. (Immediately return the remaining strips to the aluminum pouch containing a desiccant reseal carefully and store at 2-8°C).
2. Pipette 25 µL of each Calibrator (calibrators A to D), controls and patient samples in duplicate into the appropriate wells.
3. Pipette 100 µL of enzyme conjugate into each well. Avoid carry-over by holding the pipette tip slightly above the top of the well and avoid touching the plastic strip or surface of the liquid.
4. Gently mix for 15 seconds
5. Cover the plate with an adhesive seal and incubate for 45 minutes at room temperature (20-27°C).
6. Wash the plate according to procedure below.
    i. Carefully dispense 350 µL of working wash solution into each well.
    ii. Aspirate the content of each well.
    iii. Repeat four additional wash for five wash cycles.
    iv. After the last wash cycle invert the plate and tap it carefully against an absorbent paper.

Note: Automatic strip washer: Follow the manufacturer's instructions for maintenance and wash the required number of wash cycles.

7. Add 100 µL of Chromogenic solution TMB to each well using the same pipetting technique as in procedural note 3. The Chromogenic solution TMB should be added to the wells as quickly as possible.
8. Incubate for 15 min at room temperature preferentially in the dark.
9. Add 50 µL of Stop Solution, mix and read the absorbance at 450 nm (with a reference filter 620, 630, or 650 nm) in a microplate spectrophotometer within 10 min after addition of Stop Solution.

Important Note: *always add stop solution in the same order as chromogenic solution TMB.*

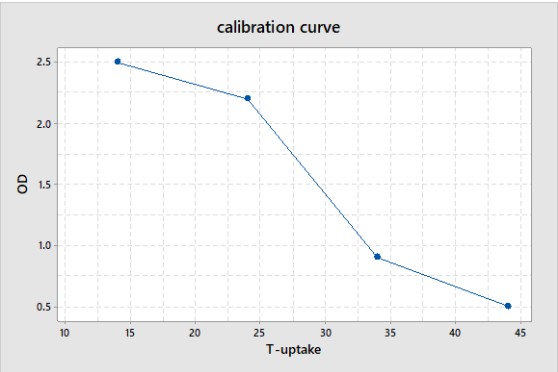
CALCULATION OF RESULTS

1. Construct a calibration curve by plotting the average O.D. (450 nm) for each calibrator on the vertical (Y) axis against the T-uptake percentage on the horizontal (X) axis, and draw the best-fit curve through the points on the graph.
2. To determine T-uptake percentage in each sample, first locate the O.D. value on the Y-axis and extend a horizontal line to the calibration curve. At the point of intersection, draw a vertical line to the X-axis and read the corresponding T-uptake percentage.
3. If a microplate spectrophotometer with built-in data calculation program is used, refer to the manual for the spectrophotometer and create a program using the concentration stated on the label of each calibrator. For automatic calculation of T-UPTAKE results, it is recommended to use point-to-point method.

Typical Data

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real-time calibration curve.

ROW	OD	T-UPTAKE
1	2.5	14
2	2.2	24
3	0.9	34
4	0.5	44



Quality control

T-Uptake control serum should be used for validation of the assay series. Range of expected results are indicated on the vial label. If assigned range is not obtained, a complete check of reagents and reader performance should be made and the assay shall be repeated. Each laboratory can also prepare its own serum pools at different levels, which can be used as internal controls in order to ensure the precision of the assay.

Reference interval:

A study with PSI T-uptake EIA kit was performed using samples from some apparently healthy people, following reference interval corresponding to 2.5th and 97.5th percentiles of results was extrapolated. Each laboratory should first investigate the transferability of the recommended expected value to its own patient population and if it does not match, determine its own reference interval.

Free thyroid index (FTI) as an indirect estimate of free thyroxine can also be calculated from following formula:

$$FTI = \frac{T-uptake \times Total\ T_4}{Mean\ T-uptake\ of\ Reference\ Lab}$$

You can calculate mean T-up by adding upper limit and lower limit of reference interval of T-uptake and divide the sum by two.

Analyte	Number	Mean (%)	2.5th percentile (%)	97.5 percentile (%)
T-uptake	137	30	25	35
FTI	-		5.4	9.7

Precision:

Precision was determined using PSI T-uptake EIA kit reagents and three pooled human sera according to EP05-A3 Guideline.

Three runs per day (morning, midday and afternoon) by three user in 10 working days ($10 \times 3 \times 3$). Results analyzed by fully nested ANOVA. Following results were obtained:

Sample Description	Mean (%)	Repeatability		Within-Laboratory Precision	
		SD	%CV	SD	%CV
Patient Pool	22.4	1.9	8.48	1.8	8.04
Patient Pool	33.1	2.9	8.76	1.92	5.80
Patient Pool	43.2	2.11	4.88	2.73	6.32

specificity

Interference evaluation from common sample abnormalities, hemolysis, Lipemia and icterus were performed according to guideline CLSI EP07-A2 and percentage interference was calculated for each sample using the equation below and normalized to the sample ferritin content.

$$\%interference = \frac{measured\ value - true\ value}{true\ value} \times 100\%$$

No interference were seen up to following listed concentration:

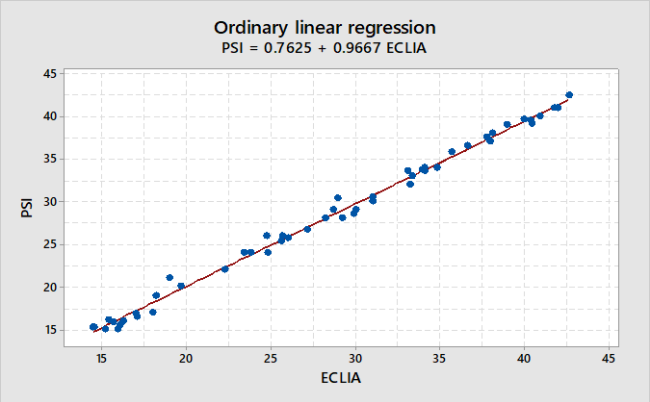
Interferent	source	Final concentration of interferent in test serum
Hemoglobin	Fresh haemolysed blood	**50 mg/mL**
Conjugated Bilirubin	Commercially crystalline Unconjugated Bilirubin	**20 mg/dL**
Triglycerides	Commercially Intralipid 10%	**1000 mg/dL**

Method comparison (Trueness)

A comparison of the PSI T-uptake EIA kit (y axis) using patient samples (n=52 range:14-43%) with Elecsis T-uptake Cobas E411-Roche diagnostic (X axis) gave the following results by Ordinary Linear regression:

$$PSI = 0.7625 + 0.9667ECLIA$$

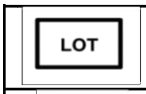
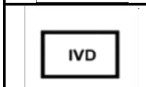
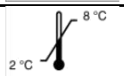
$$R^2 = 09940 \;\&\; R = 09970$$



References:

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. Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias derived from intra- and inter-individual biologic variation, https://www.westgard.com/biodatabase1.htm
5. Kasper D.L. et al. (2015). Harrison's principles of internal medicine.19th ed. Mc Graw Hill Education
6. Pagana K.D. et al. (2018). Mosby's Manual of diagnostic and Laboratory tests.6th ed. Elsevier Inc.
7. Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics.6th ed. Elsevier Inc.

SYMBOLS:

	**BATCH NUMBER**
	USE BY
	Date of Manufacture
	CONTAINS SUFFICIENT FOR <n> TESTS
	***IN VITRO* DIAGNOSTIC DEVICE**
	**TEMPERATURE LIMITATION**
	CATALOGUE NUMBER
	CONSULT INSTRUCTIONS FOR USE

Procedure in Brief