

کیت اندازه گیری هورمون T3 در سرم انسان
T3-S ELISA Kit
192 Tests: Cat. No: 10524-192
Rev: C1 (1405/06/22)

مقدمه:

تری‌یدوتیرونین (T3) و تیروکسین (T4) هورمون‌های اصلی غده تیروئید هستند که در جریان خون به صورت آزاد یا متصل به حامل‌هایی نظیر گلوبولین متصل شونده به تیروکسین (TBG) منتقل می‌شوند. غلظت T3 بسیار کمتر از T4 است ولی فعالیت و قابلیت متابولیک بسیار بالاتری دارد. این هورمون‌ها نقشی اساسی در رشد، تمایز، متابولیسم، تعادل عمومی هورمون‌ها، تکامل سیستم اسکلتی و اندام‌ها ایفا می‌نمایند. اندازه‌گیری سطح T3، T4 و TSH در خون جهت درمان و پایش اختلالات تیروئید، افتراق ترشح سمی T3 از پرکاری تیروئید و عود سمی شدن تیروئید در بیماران درمان شده اهمیت دارد. به‌طور کلی، عواملی مانند پرکاری تیروئید، بارداری، درمان با استروژن و استفاده از داروهای خوراکی ضد بارداری، منجر به افزایش ترشح T3 می‌شوند. حیطه کاربرد این کیت، اندازه‌گیری کمی غلظت تری‌یدوتیرونین در سرم انسان به روش الیزا است.

اصول آزمایش:

این تست بر اساس الیزای رقابتی طراحی شده است. بی‌حرکت سازی کمپلکس ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در سطح چاهک و آنتی‌بادی بیوتینیل‌ه مونوکلونال ضد T3 صورت می‌گیرد. نمونه‌های سرم و کالیبراتورها که حاوی T3 غیرکونژوگه هستند به‌همراه آنتی‌بادی بیوتینیل‌ه به چاهک‌ها اضافه می‌شوند و سپس، T3 کونژوگه (متصل به آنزیم HRP) درون چاهک‌ها ریخته می‌شود. به این ترتیب، T3 کونژوگه برای اتصال به جایگاه‌های محدود آنتی‌بادی (که در مرحله اول مصرف نشده‌اند) با T3 موجود در نمونه رقابت می‌کند. پس از شستشوی چاهک‌ها، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که بیشترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد. شدت جذب نوری با غلظت T3 نمونه‌ها رابطه معکوس دارد. در نهایت سطح T3 نمونه‌ها توسط منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده: دو عدد.
- ۲) کالیبراتور (T3 Cal A – F): شش ویال در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ ng/mL تهیه شده از سرم انسان.
- ۳) محلول کونژوگه آنزیمی (T3 Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی T3 متصل به آنزیم HRP.
- ۴) محلول کونژوگه بیوتینی (T3 Biotin Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی متصل به بیوتین در بافر.
- ۵) محلول (Assay Buffer): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری.
- ۶) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
- ۷) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): دو ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
- ۸) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): دو ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
- ۹) محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
- ۱۰) محلول کنترل سطح یک (Control Level 1): یک ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.
- ۱۱) محلول کنترل سطح دو (Control Level 2): یک ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.
- ۱۲) برچسب مخصوص پلیت: دو ورق.

توجه ۱: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است. توجه ۲: مقادیر کنترل (ها) در COA درج گردیده است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

- ۱) دستگاه خوانش گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
- ۲) سمپلر کالیبره.
- ۳) آب مقطر دیونیزه.

احتیاط در استفاده از کیت:

- ۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
- ۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.

- ۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- ۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBSAg، HIV1/2 و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شوند.
- ۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جدا جلوگیری کنید.
- ۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

- ۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم است. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا گردد. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
- ۲) در افرادی که دوز بالای از بیوتین ($>5 \text{ mg/day}$) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.
- ۳) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۱ روز در دمای اتاق و ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.

آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:

- ۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.

- ۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: قبل از شروع استفاده از کیت، کل حجم محلول رنگزا B (ویال روشن) را داخل محلول رنگزا A (ویال تیره) خالی نمایید و برای انجام تست تا پایان مصرف کیت استفاده نمایید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

روش انجام آزمایش:

- قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، کنترل‌ها و نمونه‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.
- ۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام تست را بردارید و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید.
- ۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و یا کنترل‌ها در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.
- ۳) حجم ۵۰ میکرولیتر از Assay Buffer در چاهک‌های مورد نظر بریزید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
- ۴) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول کونژوگه بیوتینی به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
- ۵) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- ۶) حجم ۵۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
- ۷) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- ۸) محتویات پلیت را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید و چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت اقدام کنید.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

EC REP	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
LOT	Batch code
IVD	In vitro diagnostic medical device
CE	European conformity
REF	Catalogue number
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

- McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
- Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
- Tietz. Reference information for the clinical laboratory. Hn Textbook of clinical chemistry. Burtis, CA, Ashwood, RA, WB, Saunders. Philadelphia; 1999.

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با تلفن‌های مندرج بر روی جعبه بخش پشتیبانی تماس بگیرید.

توجه: چنانچه از دستگاه‌های ایپزا پروسسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.

دفتر مرکزی: تهران - بزرگراه آشناسان - سردار جنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۸ کارخانه: کرج - کمالشهر، شهرک صنعتی بهارستان، انتهای گلستان دوم غربی، پلاک ۱۱
 تلفن: ۰۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹-۲۳

(۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست، غلظت T3 در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 10\%$ است.

No.	Sample (ng/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	0.44	-2.1	-1.7	-2.0	-2.3
2	3.16	-3.1	-2.8	-2.2	-3.0
3	5.52	2.7	-2.1	2.5	-2.3

(۵) بررسی ویژگی-آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)

ویژگی این آزمایش با اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مندرج در جدول زیر به نمونه سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین دوز ماده اضافه شده به دوز T3 مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب ارزیابی شد. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده $10 \pm 10\%$ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Analyte	Cross Reactivity	Concentration
L-Thyroid hormone	1	-
L-Thyroxine	<0.0002	10 µg/mL
Iodothyrosine	<0.0001	10 µg/mL
Diiodothyrosine	<0.0001	10 µg/mL
Diiodothyronine	<0.0001	10 µg/mL
Phenylbutazone	<0.0001	10 µg/mL
Sodium Salicylate	<0.0001	10 µg/mL

(۶) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با 0.21 ng/mL تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

$$LOB = Mean_b + 1.645 SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

(۷) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

مقادیر مورد انتظار برای تست T3 به روش ایپزا

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر برای آنالیت مورد نظر باید توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

Normal Range for Euthyroid Adults
0.52 – 2.1 (ng/mL)

پارامترهای کنترل کیفی

(۱) بررسی دقت-آزمون دقت درون‌دور (Within-Run)

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرار پذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean T3 (ng/mL)	0.49	3.6	5.5
SD (ng/mL)	0.02	0.15	0.24
CV (%)	4.1	4.2	4.4

(۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین‌دور (Between-Run)

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدید پذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean T3 (ng/mL)	0.45	3.7	5.8
SD (ng/mL)	0.02	0.16	0.26
CV (%)	4.4	4.3	4.5

(۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به اژه هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و به عنوان یک نمونه غلظت T3 در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش، $Bias < 10\%$ نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	% Rec.
1	1.72	3.58	2.65	2.70	101.8
2	4.12	5.42	4.77	4.68	98.1
3	0.9	3.90	2.40	2.48	103.3

(۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به‌دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۵ دقیقه افزایش دهید.

(۱۰) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

(۱۱) مقدار جذب نوری را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از روش Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج فرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر ارائه شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (ng/mL)
Cal. A	A1	2.693	2.726	0
	B1	2.759		
Cal. B	C1	2.036	2.089	0.5
	D1	2.142		
Cal. C	E1	1.520	1.558	1
	F1	1.596		
Cal. D	G1	0.849	0.877	2.5
	H1	0.905		
Cal. E	A2	0.467	0.485	5
	B2	0.503		
Cal. F	C2	0.262	0.273	7.5
	D2	0.284		

