

IVD-REF: PS – T3	 پیشگامان سنجش پیشگامان در تشخیص‌های و تست‌های آفری	کیت ایزا T3
Ver. No: 05		T3 ELISA KIT

آماده سازی	192 تستی	96 تستی	48 تستی	معرف
آماده مصرف	2×96 wells	1×96 wells	1×48 wells	پلیت پوشیده شده با آنتی بادی علیه T3
آماده مصرف	6 ×2.0 mL	6 ×1.0 mL	6 ×0.5 mL	کالیبراتور 1-6 (0، 0.5، 1.0، 2.5، 5.0، و 10 ng/mL) در بافر، به همراه نگهدارنده
آماده مصرف	1 ×2.0 mL	1 ×1.0 mL	1 ×0.5 mL	نمونه کنترل در بافر سازگار با سرم انسانی همراه با نگهدارنده) بازه قابل قبول سرم کنترل بر روی برچسب قید شده است)
آماده مصرف	2 ×12.0 mL	1 ×12.0 mL	1 ×6.0 mL	کونزوگه T3-HRP (قرمز رنگ)
به نسبت 1 به 20 با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید	1 ×50 mL	1 ×30 mL	1 ×30 mL	محلول شستشو غلیظ
آماده مصرف	2 ×12.0 mL	1 ×12.0 mL	1 ×6.0 mL	محلول سوپسترا-رنگ زا (تترامیتیل بنزدین و آب اکسیژنه)
آماده مصرف	1 ×12.0 mL	1 ×6.0 mL	1 ×6.0 mL	محلول توقف (اسید کلریدریک 1 مولار)

IVD-REF: PS – T3	 پیشگامان سنجش پیشگامان در تشخیص‌های تشخیصی و تست‌های	کیت الیزا T3
Ver. No: 05		T3 ELISA KIT

## کاربرد:

کیت T3 ELISA Kit شرکت پیشگامان سنجش ایستیس برای اندازه گیری کمی تری یدو تیرونین تام یا Total T3 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 بافت ها 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. همانند T4 قسمت اعظم T3 موجود در خون نیز به صورت متصل به پروتئین های TBG، پره آلبومین 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. 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 پسخوردانی (فیدبک) 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 ضرابان قلب و انقباض پذیری عضلات قلب می گردد. علاوه بر موارد یادشده هورمون های تیروئیدی در تنظیم متابولیسم کلسیم و سفر رشد و نمو جنین و کودکان نقش مهمی ایفاء می کنند.

مقدار هورمون T3 همانند 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 کبد 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 این افراد معمولاً TSH در دامنه مرجع قرار دارد. برخی از داروها نظیر آمیدارون یا پروپرانولول باعث مهار

IVD-REF: PS – T3	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الیزا T3
Ver. No: 05		T3 ELISA KIT

آنزیم یدیناز و کاهش تبدیل محیطی T4 به T3 می شوند. در این افراد علیرغم افزایش T4 شاهد کاهش T3 و TSH طبیعی یا بالا هستیم. در 95 درصد موارد تیروئید سمی یا تیروتوکسیکوز، سنجش T4 (تام یا آزاد) و TSH برای تشخیص کافی است ولی در 2 تا 5 درصد موارد افزایش فقط در T3 مشاهده می شود (سمیت T3 یا T3 toxicosis).

### اساس آزمایش :

مبنای کیت سنجش T3 شرکت تولیدی- تحقیقاتی پیشگامان سنجش ایساتیس بر پایه اصول الیزا رقابتی می باشد. در این کیت T3 موجود در استاندارد یا کنترل یا نمونه بیمار با T3 کونژوگه با آنزیم HRP برای اتصال و اشغال جایگاه های اختصاصی آنتی بادی ضد T3 متصل به فاز جامد(چاهک میکروتیتر) به رقابت می پردازند. هرچه مقدار T3 موجود در نمونه بیشتر باشد، جایگاه های بیشتری از آنتی بادی فاز جامد را اشغال می کند. در ادامه با شستشو اجزاء اتصال نایافته از محیط خارج و با افزودن محلول سوبسترا - رنگزا و انکوباسیون به مدت 15 دقیقه رنگ آبی ظاهری شود. 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 T3 موجود در سرم نسبت معکوس دارد .

### مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

1. سمپلهای 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  $1\mu\text{s/cm}$
3. دستگاه الیزا 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 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.

IVD-REF: PS – T3	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت ایزا T3
Ver. No: 05		T3 ELISA KIT

2. غلظت کالیبراتورها و نیز دامنه قابل قبول نمونه های 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 رطوبت 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 را 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  $20^{\circ}\text{C}$ - 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.

IVD-REF: PS – T3	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الیزا T3
Ver. No: 05		T3 ELISA KIT

## احتیاطات و هشدارها

1. کیت فقط برای تشخیص طبی آزمایشگاهی کاربرد دارد.
2. کلیه معرف های کیت برای سنجش مستقیم T<sub>3</sub> سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده اند و برای سنجش T<sub>3</sub> 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 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 میکروب 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 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 طور کامل 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 آزیدهای فلزی قابل انفجار کند. جهت آگاهی از نحوه رهایی پس ماندهای 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.

IVD-REF: PS – T3	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الیزا T3
Ver. No: 05		T3 ELISA KIT

## 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.
2. کیفیت آب مقطر مصرفی در کیفیت محلول شستشو و جدا کردن پیوندهای غیراختصاصی اهمیت زیادی دارد.
3. در مواردی که مقدار  $T_3$  نمونه بیش از  $10 \text{ ng/mL}$  باشد، نمونه را با یک سرم دیگر با محتوای  $T_3$  پایین رقیق و سپس آزمایش را تکرار نموده و مقدار  $T_3$  را در نمونه اولیه محاسبه کنید در نظر داشته باشید که در محاسبه مقدار  $T_3$  نمونه بالا، محتوای  $T_3$  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 الیزا 20 تا 27 درجه سانتیگراد می باشد.
6. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.
7. 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 مورد استفاده قرار گیرد.
8. جهت پپیت کردن محلول سوبسترا-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.

IVD-REF: PS – T3	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الیزا T3
Ver. No: 05		T3 ELISA KIT

13. در کلیه مراحل انجام آزمایش و متعاقب هر مرحله پیپتینگ، چاهک‌ها 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 تیمرسال باشد، با این کیت سازگار نبوده و آزمایش بروی آنها ممکن است به حصول پاسخ‌های کاذب بیانجامد.

### روش انجام آزمایش:

- 1- تعداد مناسب چاهک‌های پوشیده شده از آنتی T<sub>3</sub>، برای استانداردها، کنترل‌ها و نمونه‌های بیمار را بصورت دوتایی انتخاب کنید و مابقی چاهک‌ها را همراه ماده‌نگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.
- 2- 50 میکرولیتر از استانداردها، کنترل‌ها و نمونه‌های بیمار به داخل هر چاهک بریزید.
- 3- 100 میکرولیتر از محلول کونژوگه T<sub>3</sub>-HRP، به تمام چاهک‌ها اضافه کنید.
- 4- پلیت را بمدت 15 ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک‌ها به خوبی مخلوط شوند. سپس درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا بمدت 45 دقیقه در دمای اتاق (27°C-20) انکوبه کنید.
- 5- محتویات چاهک‌ها را خالی کرده و چاهک‌ها را طبق دستورالعمل زیر شستشو دهید:
  - برای شستشوی چاهک‌ها، ابتدا 350 میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک‌ها 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 چاهک‌ها را تخلیه نمایید.
  - بهتر است برای شستشو از دستگاه‌های اتوماتیک و اشرفی که قابل برنامه‌ریزی است استفاده نمایید. که در این صورت به دستورالعمل دستگاه شستشو مراجعه نمایید.
- 6- 100 میکرولیتر از سوپستر-رنگ‌زا آماده مصرف به تمامی چاهک‌ها اضافه کنید و آنها را بمدت 15 دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید.
- 7- 50 میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش به همان ترتیبی که محلول سوپستر-رنگ‌زا اضافه نمودید، به همه چاهک‌ها اضافه کنید. سپس حداکثر ظرف مدت 10 دقیقه جذب نوری هر چاهک را در طول موج 450 نانومتر با دستگاه الیزا ریدر قرائت نمایید (در صورت امکان از طول موج 630 نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید).

IVD-REF: PS – T3	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سیستم‌های تشخیصی و تست‌آوری	کیت الیزا T3
Ver. No: 05		T3 ELISA KIT

### 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.

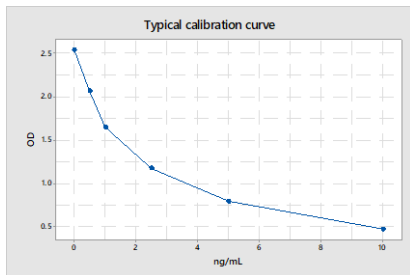
2. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور **Y** جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور **X** وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

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 **T3** 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/mL	OD
1	0.0	2.54
2	0.5	2.07
3	1.0	1.65
4	2.5	1.17
5	5.0	0.79
6	10.0	0.47





IVD-REF: PS – T3	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش تشخیصی و تشخیصی و تشخیصی	کیت الایزا T3
Ver. No: 05		T3 ELISA KIT

### کنترل کیفی:

در هر کیت یک نمونه کنترل وجود دارد که مقادیر مورد انتظار برای آن بر روی برچسب و بال 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  $T_3$  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 بر روی سرم تعدادی از مراجعه کنندگان چندین آزمایشگاه مختلف در سطح استان تهران به عمل آمد، دامنه مرجع زیر با استفاده از کیت  $T_3$  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 مورد نظر خویش راستی آزمایی (Verification) کرده و در صورت مشاهده ناهمخوانی، بازه مرجع خود را بدست آورد:

0.6-2.1	محدوده طبیعی (ng/mL)
---------	----------------------

### 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. حد شاهد (LoB) معادل غلظتی در نظر گرفته شد که 95٪ از 60 نتیجه اندازه گیری های تکراری مقدراری کمتر از آن بدست دهد. برای تعیین حد آشکارسازی 20 اندازه گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم ( $n=20 \times 3=60$ ) با محتوای  $T_3$  کمتر از  $0.3 \text{ ng/mL}$  که مقدار  $T_3$  آن به روش مستقل دیگری تعیین شده بود طی سه روز انجام شد و بزرگترین انحراف معیار اندازه گیری های تکراری بر روی

IVD-REF: PS – T3	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش تشخیصی و تشخیص آوری	کیت الیزا T3
Ver. No: 05		T3 ELISA KIT

سه نمونه یاد شده مبنای تعیین حد آشکارسازی قرار گرفت. از رابطه زیر حد آشکارسازی پس از گرد کردن روبه بالا معادل  $0.2 \text{ ng/mL}$  تعیین گردید.

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

2- دقت (Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت T3 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/mL)	Repeatability		Within-Laboratory Precision	
		SD	%CV	SD	%CV
Patient Pool	0.78	0.08	10.26	0.07	8.97
Patient Pool	1.43	0.13	9.09	0.14	9.79
Patient Pool	3.03	0.25	8.25	0.16	5.28

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 T3 پیشگامان سنجش ایساتیس با سایر ترکیبات مشابه هورمون T3 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 T3 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 T3 اولیه بیان گردید. نتایج در جدولی که در ادامه می آید خلاصه شده است:

IVD-REF: PS – T3	 پیشگامان سنجش پخشگاه در زمینه تشخیص‌های و تست‌های آزمایشگاهی	کیت ایزا T3
Ver. No: 05		T3 ELISA KIT

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

Cross-reactants	% Cross-reaction
L-T3(3,3',5-triiodothyronine)	100
rT3(3, 3', 5'-triiodothyronine, Reverse T3)	0.64
L-thyroxine	0.128

در این کیت هموگلوبین تا **50 mg/mL**، بیلیروبین تا **20 mg/dL** و تری گلیسریدها تا **1000 mg/mL** تأثیری بر سنجش ندارد.

#### 4- خطی بودن (Linearity):

ارزیابی خطی بودن از طریق رقیق سازی متوالی سه نمونه با محتوای **T<sub>3</sub>** مختلف با ماتریکس پروتئینی عاری از **T<sub>3</sub>** و مقایسه نتایج حاصل از سنجش **T<sub>3</sub>** بر روی نمونه های رقیق شده (Observed value) با نتایج موردانتظار که از ضرب مقدار **T<sub>3</sub>** اولیه در ضریب رقت بدست آمده بود (Target value)، انجام پذیرفت. نتایج در جدول زیر خلاصه شده است.

samples	Primary concentration (ng/mL)	Recovery%		
		1:2	1:4	1:8
1	1.1	105	108	110
2	3.1	102	105	109
3	4.3	95	102	106

#### 5- درستی (Trueness):

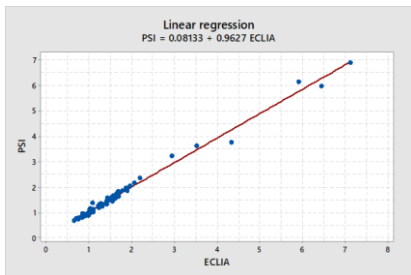
#### 5-1 ارزیابی مقایسه ای (Method comparison)

ارزیابی مقایسه ای بین نتایج اندازه گیری کیت سنجش **T<sub>3</sub>** سرم شرکت پیشگامان و روش **ECLIA-Cobas E411-Roche diagnostic** (n=80 range:0.4-7.84 ng/mL) انجام و مطابق با راهنمای **EP 09-A2** مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) به روش رگرسیون خطی تحلیل گردید. در این ارزیابی نتایج کیت پیشگامان بر روی محور عمودی (محور yها) و نتایج روش **ECLIA** بر روی محور افقی (محور xها) مشخص و نمودار رگرسیون خطی ترسیم گردید. خلاصه نتایج و نمودار رگرسیون خطی (Linear regression) در ادامه آورده شده است:

IVD-REF: PS – T3	 پیشگامان سنجش پوهنتون کابل، مرکز تحقیقات تشخیصی و تست و آوری	کیت الیزا T3
Ver. No: 05		T3 ELISA KIT

$$PSI = -0.0813 + 0.9627 ECLIA$$

$$R\text{-sq} = 0.98943$$



IVD-REF: PS – T3	 <p>پیشگامان سن-جش وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی</p>	کیت الیزا T3
Ver. No: 05		T3 ELISA KIT

منابع و مراجع:

1. CLSI. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline.2<sup>nd</sup> 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.2<sup>nd</sup> ed. CLSI document EP07-A23. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2005.
4. Jameson A.S. et al. (201). 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. 442-4). Elsevier Inc.
6. Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics.6th ed. (pp. 1580) Elsevier Inc.

IVD-REF: PS – T3	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش تشخیصی و تشخیصی	کیت الیزا T3
Ver. No: 05		T3 ELISA KIT

### خطایابی در آزمایش های الیزا

نوع مشکل	علت مشکل	راه حل
پایین بودن OD استاندارد ها و نمونه ها	افت و یا آلودگی کونزوگه	تکرار تست با کونزوگه 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.	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.
	شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	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.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	1. تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. 2. طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
صحیح نبودن نمودار استاندارد ها	طول موج خوانش نامناسب (405 nm بجای 450nm)	از سری استاندارد جدید استفاده کنید.
	آلودگی استاندارد ها	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.

IVD-REF: PS – T3	 <b>پیشگامان سنجش</b> پیشگامان در سنجش تشخیصی و تشخیصی	کیت الیزا T3
Ver. No: 05		T3 ELISA KIT

4. توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود.		
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.	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	
تکرار تست با استاندارد های جدید	آلودگی استاندارد صفر	بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD
استفاده از محلول رنگزا جدید	آلودگی محلول رنگزا	
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 و اش را چک کنید.	آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نامناسب	
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.	طول موج نامناسب در خوانش	
تکرار تست با محلول Stop جدید	آلودگی محلول Stop	
تکرار تست با مواد همان کیت	استفاده از مواد سایر کیت ها	عدم تولید رنگ در چاهک ها
تکرار تست	انجام نشدن مرحله ای از تست	
تکرار تست با محلول رنگزا جدید	آلودگی محلول رنگزا	
تکرار تست با محلول کونژوگه جدید	آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید	

IVD-REF: PS – T3	 پیشگامان سنجش پیشگام در تشخیص‌های و تست‌های	کیت الیزا T3
Ver. No: 05		T3 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 نشود.</p> <p>5. توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد.</p> <p>6. کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلر ها</p>	<p>پیپتینگ نامناسب، گرفتگی لوله داخلی سمپلر بواسطه آلودگی</p>	<p><b>عدم تکرار پذیری مناسب</b></p>
<p>فاصله زمانی بین اضافه کردن استاندارد ها و نمونه نباید بیشتر از 10 دقیقه باشد. در این صورت نتایج قابل اعتماد نیست.</p>	<p>طولانی شدن زمان انجام تست</p>	
<p>پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید.</p>	<p>نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد</p>	
<p>پیپتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.</p>	<p>باقی ماندن کونژوگه در لبه چاهکها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک ها</p>	
<p>در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک ها نباشد.</p>	<p>وجود حباب در چاهک ها</p>	
<p>کف چاهکها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید.</p>	<p>کثیف بودن کف چاهکها</p>	
<p>قبل از استفاده، ویال محلول ها را به آرامی تکان دهید.</p>	<p>مخلوط نشدن محلول های کیت</p>	



IVD-REF: PS – T3	 <p data-bbox="450 142 637 182">پیشگامان سنجش روانشناسی و مشاوره تحصیلی و شغلی</p>	کیت الایزا T3
Ver. No: 05		T3 ELISA KIT