

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

آماده سازی	96 تستی	48 تستی	معرف
آماده مصرف	1×96 wells	1×48 wells	پلیت پوشیده شده با آنتی بادی علیه T3
آماده مصرف	6 ×1.0 mL	6 ×0.5 mL	کالیبراتور 1-6 (0، 1.5، 3، 6، 12، 24 pg/mL) در بافر، به همراه نگهدارنده
آماده مصرف	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	1 ×12.0 mL	1 ×6.0 mL	کونژوگه T3-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 سوپستر-رنگ (اترامتیل بنزدین و آب اکسیژنه)
آماده مصرف	1 ×6.0 mL	1 ×6.0 mL	محلول توقف (اسید کلریدریک 1 مولار)

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

کاربرد:

کیت **Free T3 ELISA Kit** شرکت پیشگامان سنجش ایستاس برای اندازه گیری کمی هورمون تری یدوتیرونین آزاد یا **Free T3** در سرم یا پلاسما طراحی شده است.

مقدمه :

دو هورمون تیروکسین (**T₄**) و تری یدوتیرونین (**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'**-دیدیناز در بافت 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**). 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 **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 گلیسیریدها (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 فسفر 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 حاد کبدی که باعث افزایش غلظت پروتئینهای اتصال هورمون تیروئیدی 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. از آنجایی که فقط فرم آزاد هورمون از نظر بیولوژیک

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

فعال است، سنجش هورمون آزاد به ویژه در مواقع حضور عواملی که باعث تغییر در مقدار یا تمایل پروتئینهای اتصالی به هورمون های تیروئیدی می گردند، بهتر می تواند به یافتن علت ناهمخوانی نتایج هورمون تام و مقدار **TSH** سرم کمک کند. برخی از داروها نظیر آمیدارون یا پروپرانولول باعث مهار آنزیم دیدیناز 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 **Free T3** شرکت تولیدی- تحقیقاتی پیشگامان سنجش ایساتیس بر پایه اصول الیزای رقابتی می باشد. در این کیت **FT3** 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 **FT3** موجود در نمونه بیشتر باشد، جایگاه های بیشتری از آنتی بادی فاز جامد را اشغال می کند. سپس اجزای اتصال نیافته طی شستشو از محیط خارج و با افزودن محلول سوبسترا - رنگزا و انکوباسیون به مدت 15 دقیقه رنگ آبی ظاهر می شود. با افزودن محلول متوقف گر، واکنش آنزیمی متوقف می گرد. در نهایت شدت جذب نوری در 450 نانومتر اندازه گیری می شود در این کیت شدت رنگ با مقدار **FT3** 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 فرانس.
4. کاغذ رطوبت گیر
5. دستگاه وشر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر 8 کاناله یا سرنگ که قادر به ریختن 350 میکرولیتر محلول شستشو باشد.

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

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 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 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 پلاسماي EDTA نمونه مناسب برای این آزمایش است.
2. از نمونه های با کدورت بالا، همولیز یا لیپمیک ترجیحاً استفاده نشود.

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

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 مستقیم FT3 سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده اند و برای سنجش Free T3 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 فرا گرفته 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)" 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 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 برخورد با پس ماندهای آزمایشگاهی به "دستورالعمل نحوه مدیریت پسماندهای آزمایشگاهی" تالیف دکتر شهلا فارسی از

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

انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت و ویرایش 1394 مراجعه نمایید.

آماده سازی معرف ها:

1. همه معرف ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (20-27 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 نمائید.

نکات مهم در انجام تست:

1. فرایند شستشو از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. شستشوی ناکافی باعث عدم جداسدن 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 FT₃ نمونه بیش از 24 pg/mL باشد، نمونه را با یک سرم دیگر با محتوای FT₃ پایین رقیق و سپس آزمایش را تکرار نموده و مقدار FT₃ را در نمونه اولیه محاسبه کنید در نظر داشته باشید که در محاسبه مقدار FT₃ نمونه بالا، محتوای FT₃ 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. بهترین 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 سوپستر-رنگ زا و محلول توقف از میکروپیپت های حاوی قطعات فلزی استفاده نکنید.

تکنیک:

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.

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

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 تیومرسال باشد، با این کیت سازگار نبوده و آزمایش بروی آنها ممکن است به حصول پاسخ های کاذب بیانجامد.

روش انجام آزمایش:

1- تعداد مناسب چاهک های پوشیده شده از آنتی T3، 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- 50 میکرولیتر از استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار به داخل هر چاهک بریزید.

3- 100 میکرولیتر از محلول کونژوگه T3-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 (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 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 سوپسترا-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 سوپسترا-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

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

نانومتر با دستگاه ایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول موج 630 نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید).

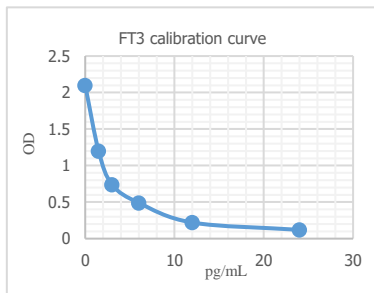
محاسبه نتایج:

- 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.
- 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.
- 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 **FT3** 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	Standards pg/ml	OD 450nm
1	0	2.1
2	1.5	1.2
3	3	0.74
4	6.0	0.49
5	12	0.22
6	24	0.12



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

تبدیل واحد: با ضرب مقدار FT3 بر حسب pg/mL در ضریب 1.54 مقدار FT3 به 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 FT3 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 FREE T3 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:

1.5-4.2	محدوده طبیعی (pg/mL)
---------	----------------------

یادآوری: در نوزادان تازه به دنیا آمده، 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 بلاتک تحت عنوان مقدار صدک 95 ام (95th percentile) از 60 بار اندازه گیری بر روی نمونه شاهد (استاندارد صفر) طی چندین ران بدست آمد. حد شاهد (LOB) معادل غلظتی درنظر گرفته شد که 95٪

IVD-REF: PS – Free T3	 پیشگامان سنجش پیشگامان سنجش، تشخیص و تست و آنالیز	کیت الیزا Free T3
Ver. No: 05		Free T3 ELISA KIT

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 ($n=20 \times 3=60$) با محتوای FT3 کمتر از 0.2 pg/mL که مقدار FT3 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 0.05 pg/mL تعیین گردید.

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

2- دقت (Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت FT3 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 ($2 \times 3 \times 3 \times 10$). نتایج با روش آماری Fully nested ANOVA تحلیل گردید: خلاصه نتایج در جدول زیر آورده شده است:

Sample Description	Mean (pg/mL)	Repeatability		Within-Laboratory Precision	
		SD	%CV	SD	%CV
Patient Pool	1.37	0.15	10.95	0.15	9.49
Patient Pool	2.47	0.13	5.26	0.13	7.29
Patient Pool	3.04	0.2	6.58	0.2	6.91

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 FT3 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 FT3 همزمان در یک ران در نمونه هایی که با ماتریکس بی اثر spike شده بودند و نمونه هایی

IVD-REF: PS – Free T3	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص‌های و تست‌های نوآوری	کیت الایزا Free T3
Ver. No: 05		Free T3 ELISA KIT

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 FT3 اولیه بیان گردید. نتایج در جدولی که در ادامه می آید خلاصه شده است:

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

Tested hormones	Concentration	Cross Reactivity%
L- T3(3,3',5-triiodothyronine)	10 pg/mL	100
L-Thyroxin	10 µg/mL	≤0.01
Diiodothyronine	10 µg/ml	<0.01
Diiodotyrosine	10 µg/m	<0.01

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 FT3 مختلف با ماتریکس پروتئینی عاری از FT3 و مقایسه نتایج حاصل از سنجش FT3 بر روی نمونه های رقیق شده (Observed value) با نتایج موردانتظار که از ضرب مقدار FT3 اولیه در ضریب رقت بدست آمده بود (Target value)، انجام پذیرفت. نتایج در جدول زیر خلاصه شده است.

Sample No	Primary Conc.(pg/mL)	Recovery%		
		1:2	1:4	1:8
1	1.8	108	101	106
2	3.84	98	103	108
3	5.54	102	104	104

5- درستی (Trueness):

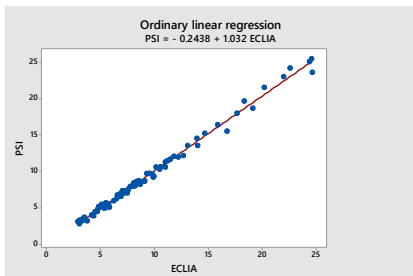
IVD-REF: PS – Free T3	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الیزا Free T3
Ver. No: 05		Free T3 ELISA KIT

1-5- ارزیابی مقایسه‌ای (Method comparison)

ارزیابی مقایسه‌ای بین نتایج اندازه‌گیری کیت سنجش FT3 سرم شرکت پیشگامان سنجش و روش ECLIA-Cobas E411-Roche diagnostic (n=80 range:0.4-22.4 pg/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:

$$PSI = -0.2438 + 1.032ECLIA$$

$$R-sq = 0.991591$$



IVD-REF: PS – Free T3	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص‌های و تست‌های نوآوری	کیت الایزا Free T3
Ver. No: 05		Free T3 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. (201). Harrison's principles of internal medicine.20th ed. (pp. 6601-20) Mc Graw Hill Education.
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 – Free T3	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش تشخیصی و تشخیصی	کیت الایزا Free T3
Ver. No: 05		Free T3 ELISA KIT

خطایابی در آزمایش های الایزا

راه حل	علت مشکل	نوع مشکل
تکرار تست با کونژوگه جدید	افت و یا آلودگی کونژوگه	پایین بودن OD استانداردها و نمونه ها
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.	پایین بودن دما و یا کوتاه بودن زمان انکوباسیون، به دما نرسیدن محلولهای کیت و نمونه بیماران	
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	
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.	طول موج خوانش نامناسب (405nm بجای 450 nm)	صحیح نبودن نمودار استانداردها
از سری استاندارد جدید استفاده کنید.	آلودگی استانداردها	
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 پیپیتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود.	پیپیتینگ نامناسب	

IVD-REF: PS – Free T3	 پیشگامان سن‌جش پژوهشگاه در زمینه تشخیص‌های و تست‌های نوآوری	کیت الایزا Free T3
Ver. No: 05		Free T3 ELISA KIT

<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>	<p>PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها</p>	
تکرار تست با استاندارد های جدید	آلودگی استاندارد صفر	
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 واشر را چک کنید.</p>	<p>آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نامناسب</p>	<p>بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD</p>
<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	
تکرار تست با مواد همان کیفیت	استفاده از مواد سایر کیفیت‌ها	
تکرار تست	انجام نشدن مرحله ای از تست	عدم تولید رنگ در چاهک‌ها
تکرار تست با محلول رنگزا جدید	آلودگی محلول رنگزا	
تکرار تست با محلول کونژوگه جدید	آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید	
<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>پیپیتینگ نامناسب، گرفتگی لوله داخلی سمپلر بواسطه آلودگی</p>	

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

<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>عدم تکرار پذیری مناسب</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>	