

MONOKIT

کیت اندازه گیری هورمون **Free T3** در سرم انسان
Free T3 ELISA Kit 96t
Cat. No: 3034-96 / Rev: A1 (1402/09/25)

مقدمه:

تری‌یدوتیرونین (T3) یکی از هورمون‌های غده تیروئید است که توسط پروتئین‌های حامل در خون جریان دارد. اصلی‌ترین پروتئین حامل این هورمون، گلوبولین متصل‌شونده به تیروکسین (TBG) است. بخش آزاد T3 (غیر متصل به پروتئین‌های حامل) مسئول کلیه اعمال بیولوژیکی این هورمون می‌باشد. غلظت پروتئین‌های حامل در شرایط متفاوتی از جمله دوران بارداری دچار تغییر می‌شود. در هنگام عملکرد نرمال تیروئید، با تغییر غلظت پروتئین‌های حامل، مقدار T3 تام سرم (tT3) نیز تغییر می‌کند؛ در حالی‌که غلظت T3 آزاد (fT3) ثابت باقی می‌ماند. مصرف قرص‌های ضدبارداری و درمان با استروژن، نیز باعث بالا رفتن سطح tT3 در خون می‌شوند؛ در حالی‌که در این شرایط سطح fT3 بدون تغییر باقی می‌ماند. حیطة کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی غلظت تری‌یدوتیرونین آزاد در سرم انسان به روش الیزا است.

اصول آزمایش:

این کیت بر اساس الیزا رقابتی طراحی شده است. نمونه‌های سرم و کالیبراتورها که حاوی fT3 آزاد و غیرکونژوگه هستند به همراه fT3 کونژوگه با آنزیم HRP درون چاهک‌ها ریخته می‌شوند. در این صورت، دو آنتی‌ژن برای اتصال به آنتی‌بادی ضد fT3 تثبیت شده در کف چاهک با یکدیگر رقابت می‌کنند و هر چه مقدار fT3 نمونه بیشتر باشد، میزان fT3 کونژوگه کمتری به آنتی‌بادی متصل می‌شود. پس از شستشوی چاهک‌ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. میزان رنگ تولید شده در نتیجه شدت جذب نوری، با غلظت fT3 موجود در نمونه نسبت معکوس دارد. در نهایت غلظت fT3 در نمونه‌ها توسط منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

- ۱) پلیت ۹۶ تستی حاوی آنتی‌بادی ضد T3 تثبیت شده.
 - ۲) کالیبراتورها (fT3 Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های مختلف درج شده بر روی لیبل ویال آن‌ها.
 - ۳) محلول کونژوگه آنزیمی (fT3 Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری.
 - ۴) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
 - ۵) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
 - ۶) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
 - ۷) محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
 - ۸) محلول کنترل (fT3 Control): ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری.
 - ۹) برچسب مخصوص پلیت: یک ورق.
- توجه ۱: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است. غلظت کالیبراتورها در هر سری تولید، ممکن است متفاوت باشد و مطابق با مقادیر نوشته شده بر روی لیبل ویال‌ها و گواهی آنالیز محصول (COA) می‌باشد.
- توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در برگه COA درج شده 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 کنید.
- 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 HBS Ag، 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 شود.

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 جداً 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) برای این آزمایش از نمونه‌های سرم استفاده کنید. 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 شود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
- ۲) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا یک ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده 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 بن ماری 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: محلول‌های رنگزا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. 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 آزمایش را بردارید و بقیه چاهک‌ها را به‌همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، کنترل و یا نمونه‌ها را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به آرامی به مدت ۳۰ ثانیه بر روی میز تکان دهید.

۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بشویند و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) بشویند. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بریزید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت اقدام نمایید.

۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از رنگزای آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. 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 به‌مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

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

۸) مقدار جذب را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). در این آزمایش محاسبه غلظت به‌روش 4PL و Point to Point قابل اجرا است؛ در صورت استفاده از روش 4PL غلظت کالیبراتور A را عددی کوچک (به‌عنوان مثال 0.01 pg/mL) در نظر بگیرید.

1: <http://www.samantajhiz.com/Support.aspx>

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
OBL	Own brand Labeling
	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 شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

۶) 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 ft_3 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
Levo-Triiodothyronine	1	10 µg/mL
Levo-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

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.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲

سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد 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.

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 ft_3 (pg/mL)	1.96	7.34	12.52
SD (pg/mL)	0.11	0.37	0.55
CV (%)	5.6	5	4.4

۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب گردید و سطح ft_3 در ترکیب به دست آمده اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش، $Bias < 10\%$ نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (pg/mL)	Added (pg/mL)	Exp. (pg/mL)	Obs. (pg/mL)	% Rec.
1	1.81	7.35	4.58	4.30	93.8
2	2.92	5.70	4.31	4.51	104.6
3	5.45	9.52	7.48	7.74	103.5

۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست، غلظت ft_3 در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 10\%$ است.

No.	Sample (pg/mL)	1/2	1/4	1/8
		% Bias		
1	7.01	-1.7	3.2	-2
2	8.11	0.1	-1.2	-0.7
3	10.21	0.4	-3.7	-3.4

۵) 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 0.835 pg/mL تعیین گردید.

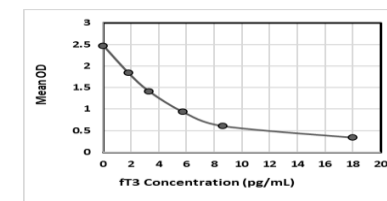
$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

$$LOB = Mean_b + 1.645 SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (pg/mL)
Cal. A	A1	2.451	2.475	0
	B1	2.499		
Cal. B	C1	1.821	1.845	1.8
	D1	1.869		
Cal. C	E1	1.398	1.415	3.3
	F1	1.432		
Cal. D	G1	0.914	0.944	5.7
	H1	0.974		
Cal. E	A2	0.597	0.610	8.6
	B2	0.623		
Cal. F	C2	0.329	0.340	18
	D2	0.351		



مقادیر مورد انتظار برای تست ft_3 به روش الیزا

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

Normal Range (pg/mL)	
Adult	1.4 – 4.2
Pregnancy	1.8 – 4.2

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 ft_3 (pg/mL)	2.44	6.8	13.76
SD (pg/mL)	0.13	0.31	0.61
CV (%)	5.3	4.6	4.4