

### کیت اندازه گیری هورمون T3 در سرم انسان

#### T3 ELISA Kit

96 Tests: Cat. No: 0724-96

192 Tests: Cat. No: 2124-192

Rev: B3 (1402/09/22)

#### 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. حیطة کاربرد این کیت، اندازه‌گیری کمی غلظت تری‌یدوتیرونین در سرم یا پلاسما انسان به روش الایزا است.

#### اصول آزمایش:

این تست بر اساس الایزای رقابتی طراحی شده است. T3 کونژوگه (متصل به آنزیم HRP) به‌همراه نمونه‌های سرم یا کالیبراتورها که حاوی T3 طبیعی (غیرکونژوگه) هستند، به چاهک‌های حاوی آنتی‌بادی تثبیت شده ضد T3 اضافه می‌شوند. در زمان انکوباسیون، رقابت میان آنتی‌ژن‌ها برای اتصال به آنتی‌بادی صورت می‌گیرد. پس از تشکیل کمپلکس‌های ایمنی و شستشوی چاهک‌ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) به چاهک‌ها و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. میزان رنگ ایجاد شده و در نتیجه شدت جذب نوری، با غلظت T3 موجود در نمونه‌ها و کالیبراتورها، نسبت عکس دارد. در نهایت غلظت T3 نمونه‌ها توسط منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

#### محتویات کیت:

کیت ۱۹۲ تستی	کیت ۹۶ تستی	محتویات کیت
دو عدد	یک عدد	میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی آنتی‌بادی تثبیت شده.
یک سری ویال با غلظت‌های متفاوت	یک سری ویال با غلظت‌های متفاوت	کالیبراتورهای T3 (T3 Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵، و ۷/۵ ng/mL تهیه شده از سرم انسان
یک ویال ۳ میلی‌لیتری	یک ویال ۱/۵ میلی‌لیتری	محلول کونژوگه آنزیمی T3 (T3 Enzyme Conjugate)
دو ویال ۱۲ میلی‌لیتری	یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری	محلول رقیق‌کننده کونژوگه (Conjugate Diluent)
یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری	یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری	محلول شستشو (50X) (Wash Solution - 50X)
دو ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	محلول رنگزا A (Substrate Solution A)
دو ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	محلول رنگزا B (Substrate Solution B)
یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری	یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری	محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop Solution)
ویال (های) ۰/۵ میلی‌لیتری	ویال (های) ۰/۵ میلی‌لیتری	محلول کنترل (T3 Control)
دو ورق	یک ورق	برچسب مخصوص پلیت

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 شده است.

#### مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

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

#### احتیاط در استفاده از کیت:

- 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.
- کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.
- 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 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) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم یا پلاسما است. از نمونه پلاسمای حاوی هپارین یا EDTA 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 گردد. 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 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 کونژوگه آنزیمی: محلول کونژوگه آنزیمی T3 (غلظت) را توسط بافر رقیق‌کننده کونژوگه با نسبت ۱:۹ رقیق کنید (برای مثال ۲۰۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی T3 را به ۱/۸ میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده کونژوگه اضافه کنید). کونژوگه آنزیمی آماده شده تا ۲۴ ساعت در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد پایدار است.

۲) 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.

۳) 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 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 کنترل در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه به‌آرامی بر روی سطح میز تکان دهید.






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

۵) محتویات پلیت را با وارونه کردن یا آسیراسیون تخلیه کنید و چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) بشوید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی 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.

<sup>1</sup> <http://www.idealdiag.com/Training.aspx>

**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 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.

#### علامت استفاده شده در برچسب کالاها

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

#### References:

1. McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
  2. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
  3. 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.

دفتر مرکزی: تهران - بزرگراه آبه‌شناسان - سردار جنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۸ کارخانه: کرج - کمالشهر، شهرک صنعتی بهارستان، انتهای گلستان دوم غربی، پلاک ۱۳ | 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)	% Bias			
		1/2	1/4	1/8	1/16
1	0.94	-1.8	2.1	-2.2	-3.3
2	3.56	-2.1	-2.4	-2.9	-3.5
3	5.19	2.4	-2.5	2.7	-2.4

#### 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-Thyriodothyronine	1	-
L-Thyroxin	<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 (LOD) و Limit of Detection و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با  $0.4 \text{ ng/mL} \pm 0.4$  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.

#### مقادیر مورد انتظار برای تست T3 به روش الیزا

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)	0.85	3.2	5.8
SD (ng/mL)	0.04	0.14	0.25
CV (%)	4.7	4.4	4.3

#### 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)	0.74	3.8	6.3
SD (ng/mL)	0.04	0.17	0.28
CV (%)	5.4	4.5	4.4

#### ۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و به‌عنوان 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	1.7	3.5	2.6	2.7	103.8
2	4.1	5.3	4.7	4.6	97.9
3	0.9	3.89	2.4	2.5	104.2

۶) 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 به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

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

۸) 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	2.274	2.307	0
	B1	2.340		
Cal. B	C1	1.598	1.651	0.5
	D1	1.704		
Cal. C	E1	1.244	1.282	1
	F1	1.320		
Cal. D	G1	0.736	0.764	2.5
	H1	0.792		
Cal. E	A2	0.483	0.501	5
	B2	0.519		
Cal. F	C2	0.380	0.391	7.5
	D2	0.402		

