

کیت سنجش هورمون Free T3 به روش الایزا

حیطه‌ی کاربرد:

کیت الایزای Free T3 پیشنهاد طبع برای اندازه‌گیری کمی هورمون تری‌یودوتیرونین آزاد (Free T3) در سرم انسان طراحی شده است. این کیت تنها برای استفاده آزمایشگاهی می‌باشد و به عنوان ابزاری کمکی در بررسی و ارزیابی عملکرد تیروئید، به ویژه در تشخیص هیپرتیروئیدیسم و اختلالات متابولیسمی، مورد استفاده قرار می‌گیرد.

مقدمه:

هورمون T3 از غده تیروئید ترشح شده و حدود ۹۹/۷ درصد آن در خون بوسیله پروتئین‌های حامل که شامل TBG، پره‌آلبومین (TBPA) و آلبومین می‌باشند حمل می‌گردد. در حدود ۰/۳ درصد از T3 به صورت آزاد و غیر متصل به پروتئین‌ها می‌باشد و در واقع همین شکل آزاد هورمون است که دارای فعالیت بیولوژیک است. هورمون T3 در سوخت و ساز سلولی و رشد و تمایز بدن موثر است؛ بنابراین مقدار T3 در خون یک فاکتور مهم در تعیین وضعیت تیروئید و متابولیسم بدن می‌باشد، اما به علت تغییر غلظت پروتئین‌های حامل در بسیاری از تغییرات کلینیکی مانند حاملگی و مصرف داروها - مصرف قرص‌های ضد بارداری، استروژن‌درمانی، مصرف فنوتین و اندروژن‌ها - T3 کل دچار تغییرات کاذب می‌شود، در حالی که مقدار Free T3 ثابت است. بنابراین اندازه‌گیری Free T3 ارتباط قابل اعتمادتری با وضعیت کلینیکی بیمار در مقایسه با T3 کل نشان می‌دهد. به علاوه، در بعضی از افراد مبتلا به هیپرتیروئیدیسم که مقدار TSH پایین و Free T4 در حد نرمال می‌باشد، تعیین مقدار Free T3 در تشخیص کمک کننده است.

اساس آزمایش:

کیت الایزای Free T3 با روش رقابتی و به کمک آنتی‌بادی مونوکلونال طراحی گردیده است. در این روش چاهک‌ها توسط آنتی‌بادی مونوکلونال که علیه مولکول T3 می‌باشد پوشش (Coating) داده می‌شوند. استانداردها و نمونه بیماران با آنتی‌بادی پوشش داده شده در ته چاهک‌ها مجاور می‌شود و پس از انکوباسیون، T3 که متصل به آنزیم HRP است به چاهک‌ها اضافه می‌شود. این T3 کونژوگه (T3-HRP) با T3 موجود در نمونه‌ها در اتصال به آنتی‌بادی‌های کوت شده در چاهک‌ها رقابت می‌کند. بنابراین هر چه مقدار T3 در نمونه بیشتر باشد مقدار T3 کونژوگه کمتری به آنتی‌بادی‌های کوت شده متصل می‌گردد و بالعکس. پس از شستشو، محلول رنگ‌زا که حاوی هیدروژن پراکسید (H₂O₂) و کروموزن است به داخل چاهک‌ها ریخته شده و انکوبه می‌گردد. پس از انکوباسیون رنگ آبی پدید آمده به صورت معکوس با غلظت T3 موجود در نمونه‌ها متناسب است. برای جلوگیری از فعالیت بیش از اندازه و نامناسب آنزیم، محلول متوقف کننده افزوده می‌گردد که فعالیت آنزیم را مختل کرده و رنگ آبی را به زرد تبدیل می‌نماید که بهترین جذب نوری را در طول موج 450 nm دارد.

محتویات کیت:

- ۱) پلیت خانه حاوی چاهک‌های پوشش داده شده با آنتی‌بادی ضد T3 (Anti-T3 Coated Plate).
- ۲) محلول آنزیم کونژوگه (Enzyme Conjugate): ویال حاوی محلول T3 کونژوگه شده با آنزیم HRP (آماده مصرف).
- ۳) سری استاندارد (Standard Set): ۶ ویال استاندارد شامل غلظت‌های صفر، ۲، ۴، ۸، ۱۲ و ۲۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر از T3.
- ۴) اسی بافر (Assay Buffer): ویال حاوی محلول بافری آماده مصرف.
- ۵) سرم کنترل (Control Serum): ویال حاوی سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال.
- ۶) محلول شستشو (Wash Solution): ویال حاوی محلول شستشوی غلیظ (۲۰X). به منظور تهیه محلول شستشوی آماده مصرف مقدار لازم از محلول شستشوی غلیظ را به نسبت ۱:۲۰ با آب مقطر رقیق کنید.
- ۷) محلول رنگ‌زای یک مرحله‌ای (Chromogen-Substrate): ویال حاوی ترامتیل‌بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده مصرف).
- ۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution): ویال حاوی اسید کلریدریک ۱ نرمال.
- ۹) برچسب مخصوص پلیت.
- ۱۰) دفترچه راهنمای محصول.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند:

- ۱) دستگاه الایزا ریدر (ELISA Reader) دارای فیلتر 450 nm (و در صورت امکان 630 nm به عنوان فیلتر مرجع).
- ۲) سمپلرهای ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر دقیق.
- ۳) آب مقطر.

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان:

- ۱) محتویات این کیت برای مصرف در همین کیت طراحی شده است.
- ۲) از مخلوط کردن محتویات کیت‌ها با شماره ساخت‌های مختلف جداً خودداری نمایید.
- ۳) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBs Ag و آنتی‌بادی‌های ضد HCV و HIV کنترل گردیده‌اند و فاقد این عوامل می‌باشند، به منظور احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می‌کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند.
- ۴) نمونه بیماران، استانداردها، کنترل‌ها و چاهک‌های استفاده شده، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند. تمامی محلول‌های واکنش‌گر و معرف‌ها باید مطابق با مقررات ملی دفع پسماندهای عفونی امحا شوند.

شرایط نگهداری:

- ۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.
- ۲) چاهک‌ها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نم‌گیر نگهداری نمایید.
- ۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آن‌ها می‌باشد.
- ۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱:۲۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۲-۸ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و مصرف می‌باشد.

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه:

سرم یا پلاسما را می‌توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود، نمونه می‌تواند برای مدت دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود ولی برای نگهداری بیش از مدت دو روز باید از دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد استفاده گردد. در ضمن باید از ذوب و انجماد مکرر نمونه پرهیز شود. از نمونه‌های مشکوک به آلودگی میکروبی برای انجام آزمایش استفاده نشود.

توضیحات عمومی:

- ۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه‌ها را به دمای اتاق برسانید.
- ۲) بهتر است به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند.
- ۳) از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید.
- ۴) پس از افزودن محلول متوقف‌کننده، جذب نوری چاهک‌ها حداکثر تا نیم ساعت قابل اندازه‌گیری می‌باشد.
- ۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهک‌ها به صورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهک‌ها تخلیه شود.
- ۶) از مهم‌ترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب، زمان انکوباسیون مناسب می‌باشد، بنابراین پیشنهاد می‌گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلول‌های مورد نیاز را آماده نموده و درب محلول‌های مورد نیاز را باز کنید، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیق‌تر می‌شود.
- ۷) به دلیل مشابه در بند ۶ بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه‌ها بیش از ۵ دقیقه بطول نینجامد.
- ۸) شستشوی صحیح با مقدار مناسب بافر شستشو جهت حصول نتایج قابل اعتماد بسیار ضروری است.

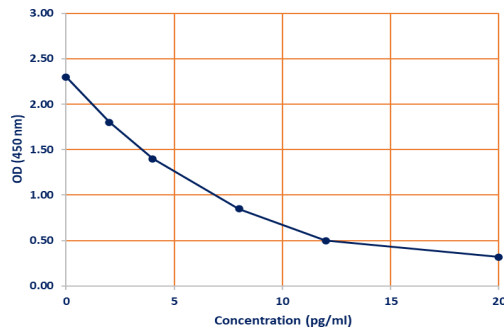
مراحل انجام آزمایش:

- ۱) تعداد چاهک‌های مورد نظر را انتخاب نموده و سایر چاهک‌ها را به همراه نم‌گیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید.
- ۲) ۵۰ میکرولیتر از هر استاندارد، سرم کنترل و نمونه را به داخل هر چاهک بریزید. پیشنهاد می‌گردد استانداردها و نمونه‌ها به صورت دوپلیکیت (Duplicate) استفاده شوند؛ به این معنی که هر استاندارد و نمونه در دو چاهک قرار گیرد و در نهایت از میانگین جذب نوری آن‌ها برای محاسبه نتایج استفاده شود. سپس، ۵۰ میکرولیتر از محلول اسبی بافر (Assay Buffer) را به هر چاهک اضافه کنید.
- ۳) پلیت را برای مدت ۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک‌ها خوب مخلوط شوند و سپس درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهک‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- ۴) ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه را به هر چاهک اضافه نمایید.
- ۵) پلیت را برای مدت ۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک‌ها خوب مخلوط شوند و سپس درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهک‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- ۶) محتویات چاهک‌ها را خالی نموده و چاهک‌ها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (برای شستشو می‌توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می‌تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد. در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو را در هر چاهک ریخته و سپس چاهک‌ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو چاهک‌ها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نم‌گیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند).
- ۷) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگ‌زا (Chromogen Substrate) را به هر چاهک اضافه نمایید.
- ۸) چاهک‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید.
- ۹) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده (Stop Solution) به هر چاهک ادامه واکنش‌های آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزا ریدر با فیلتر 450 nm استفاده نمایید (توصیه می‌شود از فیلتر 630 nm به عنوان فیلتر مرجع استفاده گردد).

محاسبه نتایج:

- ۱) از هر دستگاه الایزا ریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج 450 nm می‌توان استفاده نمود.
- ۲) جذب نوری استانداردها و نمونه‌ها را به کمک دستگاه الایزا ریدر در طول موج 450 nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر مرجع 630 nm) بخوانید.
- ۳) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آن‌ها نموداری (Point to Point) رسم کنید؛ به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آن‌ها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد به دست آورید. سپس نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی بدست آید.

استانداردها (pg/ml)	جذب نوری
۰	۲/۳
۲	۱/۸
۴	۱/۴
۸	۰/۸۵
۱۲	۰/۵
۲۰	۰/۳۲



۴) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را به دست آورده و روی محور عمودی جای آن را پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید، به طوری که این خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد؛ و بعد از محل تلاقی خط و منحنی، خطی عمود بر محور افقی وارد کنید نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد. (برای این کار می‌توانید از محاسبه گر خود کار پیشتاز طب در اینجا استفاده کنید.)

توجه: جذب‌های نوری و منحنی مربوطه فقط به عنوان نمونه می‌باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

مقادیر مورد انتظار:

مقادیر نرمال Free T3 در سرم افراد سالم که توسط تست‌های مکرر به روش الایزا بدست آمده به قرار زیر می‌باشد ولی پیشنهاد می‌گردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد:

محدوده طبیعی (pg/ml)	میانگین محدوده طبیعی (pg/ml)
۱/۹ - ۴/۳	۳/۱

محدودیت روش اندازه‌گیری:

با وجود استفاده از مواد بلاک‌کننده آنتی‌بادی‌های هتروقیل در محلول‌های کیت، به علت وجود آنتی‌بادی‌های هتروقیل با منشاءهای متفاوت در سرم افراد، امکان وجود نتایج کاذب وجود دارد. تفسیر تست‌های عملکرد تیروئیدی با نتایج یک تست امکان پذیر نبوده و نتایج این آزمایش باید با نتایج سایر تست‌های تیروئیدی به طور همزمان تفسیر شود. در هنگام تفسیر نتایج آزمایش‌های انجام شده با این کیت باید به تداخلات مختلف فیزیولوژیکی مثل مصرف داروهای خاص و سابقه بیماری توجه شود.

شاخص‌های اجرایی:

۱) حداقل مقدار قابل اندازه‌گیری:

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و منهای سه برابر انحراف معیار (SD)، حداقل غلظت Free T3 قابل تشخیص در این کیت 0.5 pg/ml می‌باشد. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP17-A2 انجام شده است.

۲) دقت آزمایش:

آزمایش‌های Intra Assay (هم‌خوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و Inter Assay (هم‌خوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایش‌های مختلف) با استفاده از ۳ سرم با غلظت‌های مختلف FT3 انجام گردید که در جداول ۱ و ۲ آمده است. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP05-A3 انجام شده است.

جدول ۱- نتایج Intra Assay.

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (pg/ml)	SD	CV (%)
۱	۲۴	۱/۲۵	۰/۰۵	۴
۲	۲۴	۲/۷۲	۰/۱۳	۴/۸
۳	۲۴	۷/۷۵	۰/۳۱	۴

جدول ۲- نتایج Inter Assay.

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (pg/ml)	SD	CV (%)
۱	۱۰	۱/۴۳	۰/۰۸	۵/۶
۲	۱۰	۲/۸۹	۰/۲۳	۷/۹
۳	۱۰	۸/۷۷	۰/۴۸	۵/۵

هر سری آزمایش به صورت داپلیکیت انجام شده است.

۳) ریکاوری آزمایش:

مقادیر معلومی از Free T3 به ۳ سرم با غلظت‌های مشخص Free T3 افزوده شد و ریکاوری آن‌ها محاسبه گردید. نتایج مربوطه در جدول ۳ آمده است. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP34 انجام شده است.

جدول ۳ - نتایج آزمایش ریکاوری.

نمونه	مقدار FreeT3 موجود در سرم (pg/ml)	مقدار افزوده شده Free T3 (pg/ml)	مقدار مورد انتظار (pg/ml)	مقدار بدست آمده (pg/ml)	ریکاوری (%)
۱	۱/۸	۱/۵	۱/۶۵	۱/۸۴	۱۱۱
۱	۱/۸	۳	۲/۴	۲/۶	۱۰۸
۱	۱/۸	۶	۳/۹	۴/۰۶	۱۰۴
۲	۳/۴	۱/۵	۲/۴۵	۲/۳۵	۹۶
۲	۳/۴	۳	۳/۲	۳/۳۵	۱۰۴
۲	۳/۴	۶	۴/۷	۴/۹۵	۱۰۵
۳	۷/۵	۱/۵	۴/۵	۴/۲	۹۳
۳	۷/۵	۳	۵/۲۵	۵	۹۵
۳	۷/۵	۶	۶/۷۵	۶/۹	۱۰۲

۴) اختصاصیت آزمایش:

اختصاصیت این آزمایش به کمک سرم‌هایی با غلظت‌های مختلف Phenylbutazone, Iodothyrosine, Diiodothyronine, Diiodothyrosine, L-thyroxine و Sodium Salicylate به منظور بررسی واکنش‌های متقاطع FT3 با سنجیده شد که نتایج آن در جدول ۴ آمده است. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP14-A3 انجام شده است.









جدول ۴ - نتایج اختصاصیت آزمایش (واکنش متقاطع).

آنالیت	غلظت (ng/ml)	غلظت ظاهری FT3 (pg/ml)
Iodothyrosine	۱۰	<۰/۵
Phenylbutazone	۱۰	<۰/۵
Sodium Salicylate	۱۰	<۰/۵
Diiodothyronine	۱۰	<۰/۵
Diiodothyrosine	۱۰	<۰/۵
L-thyroxine	۱۰	<۰/۵

منابع:

- Barker, S.B., "Determination of Protein Bound Iodine." Journal of Biological Chemistry, 173, 175, (1948). (DOI: 10.1093/ajcp/24.4 ts.483)
- Chopra IJ. A radioimmunoassay for measurement of 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T3). J Clin Invest. 197 Sep;54(3):583-92. doi: 10.1172/JCI107795. PMID: 4211761; PMCID: PMC301591. (DOI: 10.1172/JCI107795)
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests. Ann Clin Biochem. 1997 Nov;34 (Pt 6):579-81. (Doi: 10.1177/000456329703400601.)
- Sterling, L., Diagnosis and Treatment of Thyroid Disease, Cleveland CRC Press, P. 19-51 (1975). (Sterling, L., Diagnosis and Treatment of Thyroid Disease, Cleveland CRC Press, P. 19-51 (1975).)

جدول علائم:

	Use by	تاریخ انقضاء
LOT	Batch code	شماره سری ساخت
SN	Serial number	شماره سریال
	Date of manufacture	تاریخ تولید
REF	Catalogue number	شماره کاتالوگ
	Caution consult accompanying documents	توجه به مدارک همراه
	Manufacturer	تولید کننده
	Contains sufficient for <n> tests	محتویات برای n تست کافیسست
IVD	In vitro diagnostic medical devices	فراورده تشخیصی
	Temperature limitation	محدوده دمای نگهداری
	Consult instruction for use	کتابچه راهنما
	Biological risks	خطرات زیستی
CONTROL	Control	کنترل
CONTROL -	Negative control	کنترل منفی
CONTROL +	Positive control	کنترل مثبت

روش انجام آزمایش Free T3 به صورت شماتیک

چاهک‌های کوت شده با آنتی‌بادی ضد T3			
نمونه	سرم کنترل	استانداردها	محلول‌ها
-	-	۵۰ میکرولیتر	استانداردها
-	۵۰ میکرولیتر	-	سرم کنترل
۵۰ میکرولیتر	-	-	نمونه
۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	اسی بافر
پلیت را به ملایمت برای مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهک‌ها به خوبی مخلوط شوند. سپس دهانه چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بیوشانید. ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.			
۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	آنزیم کونژوگه
پلیت را به ملایمت برای مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهک‌ها به خوبی مخلوط شوند. سپس دهانه چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بیوشانید. ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهک‌ها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهک‌ها را بشویید.			
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	محلول رنگزا
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید.			
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	محلول متوقف کننده
جذب نوری چاهک‌ها را با طول موج 450 nm (و در صورت امکان 630 nm به عنوان فیلتر مرجع) اندازه‌گیری کنید.			

جدول محتویات کیت

فرمت ۱۹۲ تستی	فرمت ۹۶ تستی	فرمت ۴۸ تستی	محتویات کیت
2x96-wells	1x96-wells	1x48-wells	پلیت Plate
1x12 ml	1x6 ml	1x3 ml	محلول آنزیم کونژوگه Enzyme Conjugate
St.: 6x2 ml	St.: 6x1 ml	St.: 6x0.5 ml	سری استانداردها Standards Set
1x2 ml	1x1 ml	1x0.5 ml	محلول کنترل Control Serum
1x12 ml	1x6 ml	1x3 ml	اسی بافر Assay Buffer
2x12 ml	1x12 ml	1x6 ml	محلول رنگزای یک مرحله‌ای Chromogen - Substrate
2x50 ml	1x50 ml	1x25 ml	محل شستشو Wash Solution
2x12 ml	1x12 ml	1x6 ml	محلول متوقف کننده Stop Solution
2	1	1	برچسب مخصوص پلیت Cardboard Sealer
1	1	1	دستورالعمل استفاده Instruction for Use