

اهمیت بالینی

هورمون تری‌یدوتیرونین (T3) ترشح شده از غده تیروئید به صورت T3 متصل شونده به پروتئین و T3 آزاد در جریان خون وجود دارد. گلوبولین متصل به تیروکسین (TBG) پروتئین حامل اصلی برای گردش هورمون تیروئید است. بخش بسیار کمی از هورمون T3 در گردش خون به‌صورت آزاد بوده و این بخش از نظر بیولوژیکی فعال می‌باشد. بنابراین، اندازه‌گیری غلظت تری‌یدوتیرونین آزاد (FT3) نسبت به مقدار T3 تام سرم (tT3) با وضعیت بالینی ارتباط بیشتری دارد. غلظت پروتئین‌های حامل در بسیاری از شرایط بالینی، از جمله بارداری تغییر می‌کند. در عملکرد طبیعی تیروئید، با تغییر غلظت پروتئین‌های حامل، مقدار tT3 نیز تغییر می‌کند در حالی‌که غلظت FT3 ثابت باقی می‌ماند. تیروتوکسیکوز یا پرکاری تیروئید در اثر افزایش بیش از حد تیروکسین، FT3 یا هر دو ایجاد می‌شود. این کیت برای اندازه‌گیری کمی سطح FT3 در نمونه سرم انسان به روش الایزا کاربرد دارد.

اصول آزمایش

اساس این تست الایزای رقابتی می‌باشد. در این آزمایش FT3 کونژوگه (متصل به آنزیم HRP) به‌همراه نمونه سرم (یا کالیبراتور) حاوی FT3 طبیعی (غیرکونژوگه)، به چاهک‌های حاوی آنتی‌بادی ضد FT3 تثبیت شده اضافه می‌شوند. در زمان انکوباسیون رقابت بین FT3 موجود در نمونه و FT3 نشان‌دار برای اتصال به آنتی‌بادی‌های تثبیت شده در کف چاهک صورت می‌گیرد. پس از شستشوی چاهک‌ها، با اضافه کردن محلول سوپسترای آنزیم HRP، رنگ آبی تشکیل می‌شود که با افزودن محلول متوقف‌کننده تبدیل به رنگ زرد می‌گردد.

محصول نهایی تولید شده در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. شدت رنگ ایجاد شده و در نتیجه میزان جذب، با غلظت FT3 موجود در نمونه‌ها و کالیبراتورهای نسبت عکس دارد. در نهایت غلظت FT3 موجود در نمونه‌ها توسط منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت

۱) کالیبراتورها (Calibrators):

شامل ۶ ویال کالیبراتور با غلظت های ۰، ۰/۵، ۱، ۴/۰، ۸/۰، ۱۲/۰ و ۲۰ pg/mL.

نکته: غلظت کالیبراتورها در هر سری تولید ممکن است متفاوت باشد و مطابق با مقادیر درج شده روی لیبل ویال‌ها و گواهی محصول (COA) می باشد.

۲) محلول کونژوگه آنزیمی (FT3 Enzyme Conjugate) ۱۱ میلی‌لیتر:

یک ویال شامل محلول FT3 نشان دار شده با آنزیم.

۳) پلیت ۹۶ تستی:

یک پلیت حاوی آنتی‌بادی ضد FT3 تثبیت‌شده که به‌همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی بسته‌بندی شده است.

۴) محلول شستشو غلیظ (Wash Buffer-50X) ۲۰ میلی‌لیتر:

یک ویال شامل سورفاکتانت محلول شده در بافر فسفات.

۵) محلول سوپسترا A (Substrate A) ۶/۵ میلی‌لیتر:

یک ویال محلول تترا متیل بنزیدین (TMB).

۶) محلول سوپسترا B (Substrate B) ۶/۵ میلی‌لیتر:

یک ویال محلول هیدروژن پراکساید (H2O2).

۷) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution) ۱۲ میلی‌لیتر:

یک ویال حاوی محلول متوقف‌کننده واکنش.

۸) محلول کنترل سطح یک (Control Level 1): یک ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.

۹) محلول کنترل سطح دو (Control Level 2): یک ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.

۱۰) برجسب مخصوص پلیت: یک ورق.

توجه ۱: کلیه اجزای کیت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود. محلول متوقف‌کننده را می‌توان در دمای اتاق نگهداری کرد.

توجه ۲: مقادیر کنترل (ها) در برگه COA درج شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

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

موارد احتیاط در استفاده از کیت

این کیت برای انجام تست‌های تشخیصی در محیط‌های آزمایشگاهی کاربرد دارد. محتویات کیت منشاء سرم انسانی داشته و از نظر عدم وجود HBsAg و آنتی‌بادی‌های ضد HIV1/2 و HCV کنترل شده‌اند، اما از آنجا که هیچ روشی به‌طور صددرصد نمی‌تواند منفی بودن این موارد را تأیید نماید، بنابراین لازم است هنگام استفاده از کیت، مراقبت‌های لازم به عمل آورده شود.

- محتویات تعبیه شده در این کیت برای استفاده در همین سری ساخت بوده و از استفاده مشترک با سایر سری‌ساخت‌ها خودداری فرمایید.
- برای دریافت نتایج بهتر و دقیق‌تر فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ چاهک‌ها رعایت شود. این فاصله زمانی نباید به گونه ای باشد که منجر به اثر دررفت (drift) گردد. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل این نکته حائز اهمیت است. دقت نمایید محلول‌ها نزدیک به ته چاهک ریخته شوند.
- شستشوی نامناسب می‌تواند باعث بوجود آمدن نتایج اشتباه در آزمایش شود.
- کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از استفاده از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است خودداری نمایید.

جمع آوری و تهیه نمونه‌ها

- نمونه مورد استفاده در این آزمایش سرم انسانی می‌باشد که از خون سیاهرگی تهیه شده و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا می‌گردد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
- نگهداری سرم باید در لوله‌های در بسته انجام شود. نمونه‌ها تا ۱ روز در دمای اتاق و تا ۷ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری می‌باشد و در صورت استفاده برای مدت زمان طولانی‌تر (حداکثر تا ۳۰ روز) در دمای ۲۰- درجه

سانتی‌گراد نگهداری شوند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.

آماده سازی محلول‌ها

محلول شستشو: کل حجم ویال محلول شستشو (50X) را با ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید. محلول آماده شده 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.

محلول سوپسترا: قبل از شروع استفاده از کیت، کل حجم محلول رنگزا B (ویال روشن) را داخل محلول رنگزا A (ویال تیره) خالی نمایید و برای انجام تست تا پایان مصرف کیت استفاده نمایید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

مراحل انجام تست

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کلیه ویال‌های کالیبراتور، کنترل‌ها و نمونه‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت نمایید.

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را جدا نموده و چاهک‌های باقی مانده به همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده، درب آن را ببندید و در دمای ۸-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، کنترل‌ها و نمونه‌های بیمار را در داخل چاهک‌های مورد نظر بریزید. پیشنهاد می‌شود از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود و از میانگین جذب نوری آنها استفاده شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به تمامی چاهک‌ها اضافه کنید. پلیت را ۳۰-۲۰ ثانیه به آرامی روی سطح میز تکان دهید.

۴) پلیت را به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک‌ها را در روش دستی با وارونه کردن پلیت و در روش دستگاهی با اسپریه کردن کاملاً تخلیه نمایید.

۶) چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده‌سازی محلول‌ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در

انتهای شستشو به منظور تخلیه کامل مایعات، پلیت را به آرامی بر روی دستمال رطوبت گیر بزنید.

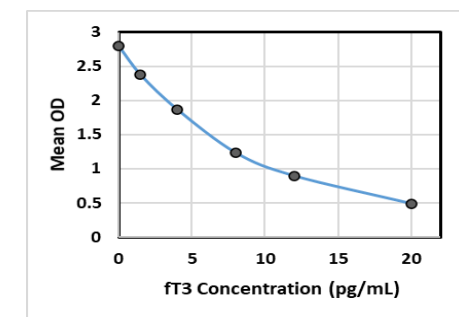
۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترای آماده شده (به بخش آماده سازی محلول ها مراجعه شود) به چاهک ها اضافه نمایید و با برچسب پلیت بیوشانید. سپس پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری فرمایید.

توجه: اگر بیشترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می توانید زمان انکوباسیون محلول سوبسترا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۸) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده به چاهک ها اضافه نموده و به مدت ۲۰-۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید.

۹) جذب نوری چاهک ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر در زمان کمتر از ۱۵ دقیقه بخوانید (از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ استفاده نمایید). محاسبه غلظت به روش Point to Point نیز قابل اجرا است اما روش 4PL در این تست ارجحیت دارد. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است. در صورت استفاده از روش 4PL غلظت کالیبراتور A را عددی کوچک (به عنوان مثال 0.01 pg/mL) در نظر بگیرید.

Calibrators	Well Number	Abs.	Mean Abs	Conc. (pg/mL)
Cal. A	A1	2.770	2.796	0
	B1	2.822		
Cal. B	C1	2.364	2.375	1.5
	D1	2.386		
Cal. C	E1	1.858	1.870	4
	F1	1.882		
Cal. D	G1	1.219	1.236	8
	H1	1.253		
Cal. E	A2	0.871	0.897	12
	B2	0.923		
Cal. F	C2	0.462	0.490	20
	D2	0.518		



نکته: جذب نوری به دست آمده از کالیبراتور ها و همچنین منحنی فوق فقط به عنوان مثال ذکر شده و در هر آزمایشگاهی در هر مرتبه آزمایش باید منحنی جدیدی ترسیم گردد.

مقادیر مورد انتظار

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 (pg/mL)	
Less than Normal	< 1.7
Normal	≥ 1.7 – 4.2 ≥
More than Normal	> 4.2
Pregnancy	1.8 – 4.2

پارامترهای کنترل کیفی

Intra – Assay

دقت درون تستی با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با غلظت های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار) بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean fT3 (pg/mL)	1.17	4.21	7.1
SD (pg/mL)	0.06	0.21	0.33
C.V. (%)	5.1	5	4.6

Inter – Assay

دقت بین تستی با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با غلظت های متفاوت در چهار نوبت کاری (هر نوبت پنج بار تکرار) بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean fT3 (pg/mL)	1.01	3.9	6.7
SD (pg/mL)	0.06	0.22	0.35
CV (%)	5.9	5.6	5.2

Recovery

در این تست دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به عنوان یک نمونه، مقدار fT3 در آن اندازه گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 10\%$ است.

No.	Sample (pg/mL)	Added (pg/mL)	Exp. (pg/mL)	Obs. (pg/mL)	% Rec
1	1.3	6.8	4.05	4.63	114.3
2	4.7	1.6	3.15	3.06	97.1
3	7.9	3.7	5.8	5.64	97.2

Linearity

در این تست، غلظت fT3 در رقت های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 10\%$ است.

No.	Sample (pg/mL)	1/2	1/4	1/8
		% Bias		
1	7.2	2.8	-2.9	3.2
2	8.4	-1.5	3.1	-0.8
3	9.1	-1.2	-2.8	-3.4

Cross Reactivity

اختصاصیت این آزمایش با اضافه کردن غلظت های مختلفی از مواد مداخله گر به سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه گیری نسبت بین دوز ماده مداخله گر به دوز fT3 مورد نیاز برای همان مقدار جذب ارزیابی شد.

Analyte	Cross Reactivity	Conc.
L-T3	1	
L-T4	<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
Sodiumsalicylate	<0.0001	10 µg/mL

Sensitivity

بر اساس جمع میانگین جذب کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف معیار، حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت ۱۰ pg/mL می باشد.

Stability

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی گراد.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی گراد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می باشد.

منابع

1. Pederson, K.O, Scand. *J. Clin. Lab Invest*, **34**, 247 (1974)
2. Wild, D., *Immunoassay Handbook*, Stockton Press, 339 (1994).
3. Wenzel, K.W., *Metabolism*, **30**, 717 (1981)
4. Bhagat, C., et.al, *Clin Chem*, **29**, 1324 (1983).
5. Lundberg, P.R., et.al, *Clin Chem*, **28**, 1241 (1982).
6. Melmed, S. et.al, *J Clin Endocrinol Metab*, **54**, 300 (1982).
7. Laloz M.R., et al, *Clin Endocrinol*, **18**, 11 (1983).

در صورت بروز هرگونه مشکل با بخش پشتیبانی شرکت تینا پژوهان آروین تماس حاصل فرمایید.

توجه: چنانچه از دستگاه های ایزا پروسسور استفاده می کنید، می توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.

