

اهمیت بالینی

تری‌یدوتیرونین (T3) یک هورمون تیروئیدی است که در جریان خون به‌صورت آزاد یا متصل به حامل‌هایی نظیر گلوبولین متصل شونده به تیروکسین (TBG) منتقل می‌شود. بیشترین میزان T3 موجود در خون از تبدیل T4 به T3 در بافت‌های محیطی از جمله کبد و کلیه به وجود می‌آید و میزان کمتری از تیروئید ترشح می‌شود. T3 با فعالیت متابولیک بالا، نقش اساسی در رشد، تمایز، متابولیسم، تعادل عمومی هورمون ها، تکامل سیستم اسکلتی و اندام‌ها ایفا می‌نماید. سطح T3 در پرکاری تیروئیدی و تیروئیتیکوز (مسمومیت T3) افزایش و در کم‌کاری تیروئید، بیماری‌های کبدی و برخی از سرطان‌ها کاهش می‌یابد. حیطة کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی غلظت تری‌یدوتیرونین در سرم یا پلاسما انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش

اساس این تست الایزای رقابتی می‌باشد. در این آزمایش T3 کونژوگه (متصل به آنزیم HRP) به‌همراه نمونه سرم یا کنترل و یا کالبراتور حاوی T3 طبیعی (غیرکونژوگه)، به چاهک‌های حاوی آنتی‌بادی تثبیت شده اضافه می‌شوند. در زمان انکوباسیون رقابت بین T3 موجود در نمونه و T3 نشان‌دار برای اتصال به آنتی‌بادی‌های تثبیت شده در سطح چاهک صورت می‌گیرد. پس از شستشوی چاهک‌ها، با اضافه کردن محلول سوبسترای آنزیم HRP، رنگ آبی تشکیل شده 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 T3 موجود در نمونه‌ها و کالبراتورها نسبت عکس دارد. در نهایت غلظت T3 موجود در نمونه‌ها توسط منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت

۱) کالبراتورها (Calibrators):
شامل ۶ ویال کالبراتور با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵ ng/mL.

نکته: کالبراتورها بر پایه سرم انسانی تهیه شده‌اند.

۲) محلول کونژوگه آنزیمی (T3 Enzyme Conjugate)
۳ میلی‌لیتر:

یک ویال شامل محلول T3 نشاندار شده با آنزیم.

۳) محلول بافر کونژوگه (Conjugate Buffer)
۱۲ میلی‌لیتر:

دو ویال شامل بافر کونژوگه.

۴) پلیت ۹۶ تستی:

دو پلیت حاوی آنتی‌بادی ضد T3 تثبیت‌شده که به‌همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی بسته‌بندی شده است.

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

یک ویال شامل سورفاکتانت محلول شده در بافر فسفات.

۶) محلول سوبسترای A (Substrate Solution A)
۶/۵ میلی‌لیتر:

دو ویال محلول تترا متیل بنزیدین (TMB).

۷) محلول سوبسترای B (Substrate Solution B)
۶/۵ میلی‌لیتر:

دو ویال محلول هیدروژن پراکساید (H2O2).

۸) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution)
۱۲ میلی‌لیتر:

یک ویال حاوی محلول متوقف‌کننده واکنش.

۹) سرم کنترل (T3 Control):

ویال(های) حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر سرم کنترل.

۱۰) برچسب مخصوص پلیت:

دو 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.

موارد احتیاط در استفاده از کیت

• این کیت برای انجام تست‌های تشخیصی در محیط‌های آزمایشگاهی کاربرد دارد. محتویات کیت متشاء 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 سری ساخت‌ها 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 دریفت (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 یا پلاسما (حاوی هپارین یا EDTA) 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. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.

• نگهداری سرم باید در لوله‌های در بسته انجام شود. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری می‌باشند 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: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از ویال محلول شستشو (50X) را با ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید. محلول آماده شده را 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 سوبسترا:** 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.

• **محلول کونژوگه آنزیمی (آماده مصرف):** محلول کونژوگه آنزیمی را با بافر کونژوگه به نسبت ۱:۱۰ رقیق کنید. به‌عنوان مثال، برای ۱۰ چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر کونژوگه غلیظ به ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر کونژوگه اضافه نمایید. این محلول باید به صورت روزانه آماده شود و زمان پایداری آن پس از آماده سازی ۲۴ ساعت می‌باشد.

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 کالبراتور، کنترل و نمونه‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت نمایید.

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را جدا نموده و چاهک‌های باقی مانده به همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده، درب آن را ببندید و در دمای ۲-۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالبراتورها، نمونه‌های بیمار و کنترل را در داخل چاهک‌های مورد نظر بریزید. پیشنهاد می‌گردد که از هر نمونه یا کالبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود و از میانگین جذب نوری آنها استفاده شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آماده شده (بخش آماده سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) به تمامی چاهک‌ها اضافه کنید. پلیت را ۳۰ - ۲۰ ثانیه به‌آرامی روی سطح میز تکان دهید.

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

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

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

منابع

1. Barker, S.B., "Determination of Protein Bound Iodine." Journal Biological Chemistry, 173, 175, (1948).
2. Chopra, I.J., Solomon, D.H., and Ho, R.S., "A Radioimmunoassay of Triiodothyronine," J. Clinical Endocrinology, 33, 865 (1971).
3. Young, D.S., Pestaner, L.C., and Gilberman, U., "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests." Clinical Chemistry, 21, 3660 (1975).
4. Sterling, L., Diagnosis and Treatment of Thyroid Disease, Cleveland CRC Press, P. 19-51 (1975).

در صورت بروز هرگونه مشکل با بخش پشتیبانی شرکت

تینا پژوهان آروین تماس حاصل فرمایید.

توجه: چنانچه از دستگاه‌های الایزا پروسسور استفاده

می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت

دریافت نمایید.



DIAPLUS

شرکت تینا پژوهان آروین
سهروردی شمالی، پایین تر از آپادانا،
کوچه فیروزه، پلاک ۳ واحد ۱ و ۲
تلفن: ۰۲۱-۴۱۷۹۶۰۰۰

Cross Reactivity

اختصاصیت این آزمایش با اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مداخله‌گر به سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین دوز ماده مداخله‌گر به دوز T3 مورد نیاز برای همان مقدار جذب ارزیابی شد.

Analyte	Cross Reactivity	Concentration
L-Thyriodothyronine	1	-
L-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

Sensitivity

بر اساس جمع میانگین جذب نوری کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف معیار حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت ۰/۰۴ ng/mL می‌باشد.

Stability

Accelerated Stability Test
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 به‌صورت 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.

Normal Range For Adults

0.52 – 2.1 ng/mL

پارامترهای کنترل کیفی

Intra – Assay

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean T3 (ng/mL)	0.83	1.63	6.2
SD (ng/mL)	0.05	0.09	0.28
CV (%)	6	5.5	4.5

Inter – Assay

دقت بین‌تستی با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های 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 T3 (ng/mL)	0.62	3.2	5.4
SD (ng/mL)	0.04	0.18	0.28
CV (%)	6.4	5.6	5.1

Recovery

در این تست دو نمونه سرم به‌نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به‌عنوان یک نمونه، مقدار T3 در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 10\%$ است.

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	% Rec.
1	1.7	0.75	1.22	1.26	103.2
2	1.83	5.3	3.56	3.6	101.1
3	0.69	6.85	3.77	3.69	97.8

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)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	1.14	-1.8	2.7	-0.2	-1.3
2	3.56	-2.1	-2.4	-2.9	-2.5
3	5.19	2.4	-2	1.7	-0.4

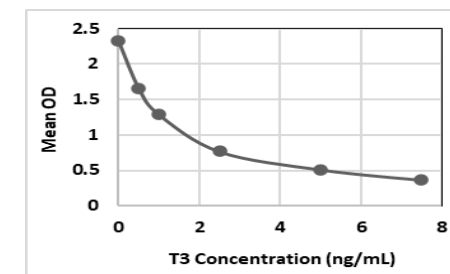
در انتهای سستشو به‌منظور تخلیه کامل مایعات، پلیت را به‌آرامی بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

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

(۸) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به چاهک‌ها اضافه نموده و به‌مدت ۲۰-۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید.

(۹) جذب نوری چاهک‌ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با روش Point to Point در کمتر از ۱۵ دقیقه بخوانید (از طول‌موج فرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده نمایید).

Calibrators	Well Number	Abs	Mean Abs	Conc. (ng/mL)
Cal. A	A1	2.298	2.304	0
	B1	2.311		
Cal. B	C1	1.588	1.614	0.5
	D1	1.641		
Cal. C	E1	1.251	1.281	1
	F1	1.311		
Cal. D	G1	0.701	0.721	2.5
	H1	0.742		
Cal. E	A2	0.485	0.498	5
	B2	0.512		
Cal. F	C2	0.365	0.387	7.5
	D2	0.409		



نکته: جذب نوری به‌دست آمده از کالیبراتورها و همچنین منحنی فوق فقط به‌عنوان 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.