www.padyabteb.com

T3

Thyroid ELISA Kits

REF: PT-ET3-101

IVD

مقدمه

هورمون‌های T4 و ۳، ۵، ´۳، تری یدو تیرونین (T3) در گردش خون با اتصالات ضعیفی به پروتئین‌های ناقل پلاسما شامل TBG (گلوبولین متصل شـونده تیروکسـین) و TBPA (پیش آلبومین متصل شونده تیروکسین) وصل شـده‌اند. غلظت T3 موجود در گردش خون بطور قابل ملاحظه‌ای از غلظت T4 کمتر است، اما از لحاظ بیولوژیکی بسیار فعال‌تر از T4 می‌باشد.

اندازه گیری غلظت T3 در تشخیص بیماری‌های تیروئید عامل مهمی محسوب می‌شود. تعیین غلظت T3 در شناسائی موارد پرکاری تیروئید بـا غلظت T4 طبیعی و T3 افزایش یافته اهمیـت دارد. افزایش T3 بـدون افزایش در T4 غالباً نشـان دهنده عود پـرکاری تیروئید در بیماران درمان شده قبلی است. یکی دیگر از کاربردهای بالینی T3 در بیماران با عملکرد طبیعی غده تیروئید است، که تنها با غلظت طبیعی T3 قابل تایید است؛ اگر چه غلظت T4 پایین باشد.

انـدازه گیـری T3 همچنین در پایش بیماران مبتـلا به پرکاری تحت درمان و بیماران بهبود یافته که درمان خود را قطع کرده‌اند، سودمند می‌باشد. به خصوص در تشخیص بین پرکاری و عملکرد طبیعی غده تیروئید (یوتیروئید) ارزشمند است.

عـلاوه بر پرکاری تیروئید، غلظت T3 همانـند T4 در دوران بارداری، دریافت قرص‌های ضد بارداری یا استروژن درمانی افزایش می یابد، که نتیجه افزایش غلظت پروتئین TBG می‌باشـد. همچنین کاهش غلظـت TBG با کاهش غلظـت T3 همراه می‌گـردد. این تغییرات در غلظت T3، انعکاس درستی از وضعیت غده تیروئید نشان نمی‌دهند.

در اکثر موارد هیپرتیروئیدی مقدار T3 و T4 توأماً بالاسـت ولی در بعضـی از حالات مانند Thyrotoxicosis غلظت T3 به تنهایی بالا بوده در حالیکـه T4 و TBG طبیعی هسـتند. مقادیر بالای T3 همچنین در ندول‌های تیروئید و ادنوم توکسیک پلامر دیده می‌شود.

اساس روش اندازه‌گیری

این تســت به کمک آنتی بادی مونوکلونال به روش رقابتی طراحی شده است.

در این تســت چاهک‌ها توســط آنتی بادی مونوکلونال Anti – T3 پوشــش داده می‌شــوند. مقدار مشــخصی ســرم و آنتــی ژن T3 کونژوگه شــده با آنزیــم HRP به چاهک‌ها اضافه می‌شــود. جهت انــدازه گیری غلظــت توتــال T3 و جداســازی T3 از پروتیین‌های پلاســما از ANS (۸–آنیلینــو–۱ – نفتالــن ســولفونات) اســتفاده می‌شــود.HRP-T3 و T3 موجود در سرم و استاندارد جهت اتصال بــه آنتی بــادی مونوکلونال Anti-T3 موجــود در چاهک‌ها در زمان انکوباسیون باهم رقابت می‌کنند.

پــس ازگذشــت زمــان انکوباســیون (۴۵ دقیقه) در دمــای اتاق و شستشــو چاهک‌ها توسط محلول شستشــو دهنده و اضافه کردن محلول سوبسترا و محلول رنگزا و انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه، رنگ آبی ظاهر می‌گردد. با اضافه کردن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شــود. شدت رنگ در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری می‌گردد.

واکنش آنزیمی و تشکیل رنگ با میزان T3 رابطه عکس دارد.

محتویات کیت

ردیف	نام محصول	حجم/ تعداد
1	پلیت پوشانده شده با آنتی بادی مونوکلونالAnti-T3 (Anti T3 Coated plate)	1X96 test
2	محلول آنزیم کونژوگه آماده مصرف (T3 Enzyme conjugate)	1X12 ml
3	استاندارد در غلظت 0.0 ng/ml (Cal T3 0.0 ng/ml) در بافر حاوی نگهدارنده	1X1 ml
	استاندارد در غلظت 0.5 ng/ml (Cal T3 0.5 ng/ml) در بافر حاوی نگهدارنده	1X1 ml
	استاندارد در غلظت 1.0 ng/ml (Cal T3 1.0 ng/ml) در بافر حاوی نگهدارنده	1X1 ml
	استاندارد در غلظت 2.5 ng/ml (Cal T3 2.5 ng/ml) در بافر حاوی نگهدارنده	1X1 ml
	استاندارد در غلظت 5.0 ng/ml (Cal T3 5.0 ng/ml) در بافر حاوی نگهدارنده	1X1 ml
	استاندارد در غلظت 10 ng/ml (Cal T3 10 ng/ml) در بافر حاوی نگهدارنده	1X1 ml
4	بافر شستشوی غلیظ 20X (Wash Buffer)	1X30 ml
5	محلول سوبسترا – رنگزا (Chrom Substrte)	1X11ml
6	محلول متوقف کننده (Stop Solution)	1X6 ml
7	سرم کنترل به همراه نگهدارنده (Control serum)	1X1ml
8	برچسب مخصوص پلیت	۱ عدد

+ محلول شستشو، رنگزا و متوقف کننده در همه کیت‌ها مشترک می‌باشند.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند

1- سمپلرهای ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری

2- آب مقطر

3- دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری به عنوان فیلتر رفرانس

4- کاغذ جاذب رطوبت

نگهداری کیت

1- کیت در یخچال در دمای ۸-۲ °C نگهداری شود.

2- میکروپلیت‌ها باید در کیسه در بسته به همراه نمگیر نگهداری شود.

3- مدت زمان پایداری کیت تا پایان تاریخ انقضا (یکسال از زمان تولید) نوشته شده برروی برچسب کیت می‌باشد.

4- کیت‌های بازشده اگر در شرایط توصیه‌شده در بالا نگهداری شود، حداقل به مدت سه ماه پایدار خواهد بود.

جمع‌آوری و آماده سازی نمونه

پس از جداســازی سرم از نمونه خون بیمار، نمونه‌ها را می‌توان به مدت ۴۸ ســاعت در درمای ۸-۲ °C نگهداری شوند. جهت نگهداری طولانی‌تر، نمونه‌ها باید در دمای ۲۰ °C- نگهداری شوند. نمونه‌های ذوب شده باید قبل از آزمایش مخلوط شوند. بهتر است ترجیحاً از نمونه‌های با کدورت بالا، همولیز و لیپمیک استفاده نشود. در ضمن باید از فریز و ذوب مکرر نمونه‌ها (Freeze-Thaw) اجتناب گردد.

نکات قابل توجه

1- کیت فقط جهت استفاده در آزمایشگاه تشخیصی کاربرد دارد.

2- استفاده از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه جهت دقت و صحت بیشتر.

3- چاهک‌ها از نظر وجود حباب بررسی شوند، در صورت وجود حباب با ضربه آهسته به پلیت خارج شوند.

4- عدم ترکیب اجزاء کیت با سری ساخت متفاوت.

5- جلوگیری از تعویض درب معرف‌ها.

6- از تمــاس معــرف بــه ویــژه محلــول متوقــف کننده کــه حاوی اسیدکلریدریک است با پوست جلوگیری شود (در صورت تماس با آب کافی شستشو داده شود).

7- از اســتعمال دخانیات، خوردن و آشــامیدن در محل کار اجتناب شود.

8- از پی‌پت کردن مواد با دهان پرهیز شود.

9- از دستکش و لباس مناسب استفاده شود.

+ جهت ســاخت برخی از اجزای این کیت از سرم انسانی که از نظر HCV، HbsAg، HIV منفی می‌باشد، استفاده شده است.

آماده سازی معرف‌ها

1- همه معرف‌ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (۲۸–۲۲ درجه سانتی گراد) برسند.

2- تهیه محلول شستشو: برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمائید.

نکته‌های مهم

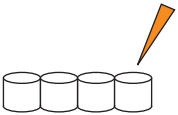
1- توصیه می‌شود که بیشتر از ۳۲ چاهک در هر ران کاری استفاده نشود. اگر پی‌پت به صورت دستی انجام می گیرد، پی‌پت کردن همه استانداردها، نمونه‌ها، کنترل‌ها باید در ۵ دقیقه تمام شود. برای پی‌پت کردن کل پلیت ۹۶ تستی باید از پی‌پت اتوماتیک استفاده شود.

2- فرایند شستشو خیلی مهم است. شستشوی ناکافی باعث کاهش دقت و افزایش کاذب جذب می شود.

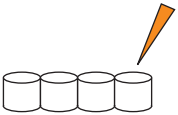
روش انجام آزمایش

1- انتخاب تعداد چاهک‌های کوت شده برای استانداردها، سرم کنترل و نمونه‌های بیمار بصورت دوتایی و قرار دادن مابقی چاهک‌ها در کیسه مخصوص به همراه نمگیر و بستن درب آن.

2- ۵۰µl استانداردها، سرم کنترل و نمونه‌های بیمار به چاهک‌ها اضافه نمایید.



3- ۱۰۰µl کونژوگه آنزیم HRP-T3 به تمام چاهک‌ها اضافه نمایید.



4- پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید و سپس درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و ۴۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید.

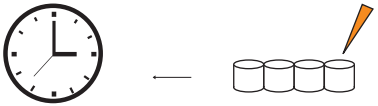
5- محتویات چاهک‌ها را خالی کنید و چاهک‌ها را ۵ بار با ۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشوی آماده مصرف شستشو دهید. سپس چاهک‌ها را وارونه کنید و همراه با تکان دادن خالی کنید و در انتهای شستشو با ضربات ملایم بر روی کاغذ جاذب تمامی مایع موجود در چاهک‌ها را تخلیه نمایید.

محتویات چاهک‌ها تخلیه شود

۵ بار شستشو با ۳۵۰ میکرولیتر بافر

به وسیله کاغذ جاذب خشک کنید

6- ۱۰۰µl از سوبسترای آماده مصرف به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید.



۱۰۰ λ محلول سوبسترای (TMB)

۱۵ دقیقه انکوبه در دمای اتاق ۲۵ °C

7- ۵۰ µl از محلــول متوقف کننده به همــه چاهک‌ها اضافه کنید. سپس جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت کنید (در صورت امکان از طول موج ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس اســتفاده کنید). سنجش جذب نوری باید حداکثر تا ۱۵ دقیقه پس از انجام آزمایش انجام شود.

۵۰ میکرولیتر محلول STOP به تمام چاهک‌ها

ELISA READER

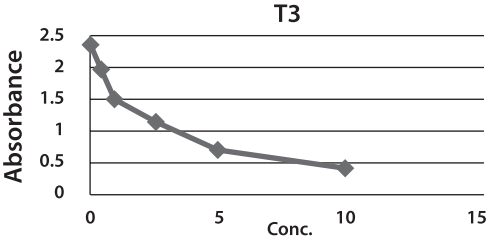
محاسبه‌نتایج

1- با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها (محور Y) و غلظت مشـخص آنها (محور X) برروی کاغذ میلی‌متری، منحنی استانداردی رسم کنید.

2- میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سـپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

راهنمای محاسبه

مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل تنها به عنوان راهنمایی آورده شـــده است و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید بدست آورد.



ردیف	مقدار استاندارد (ng/ml)	جذب نوری
۱	۰	۲/۳۴
۲	۰/۵	۱/۹۳
۳	۱	۱/۵۴
۴	۲/۵	۱/۱۵
۵	۵	۰/۷۱
۶	۱۰	۰/۴۵

مقادیر طبیعی

بدلیل اختلافات سـنی، نژادی و رژیم تغذیـه، نمی‌توان برای تمام جمعیت‌ها محدوده مرجع تعیین کرد. بنابراین هر آزمایشـگاه باید محدوده مرجع خود را گزارش نماید. مقادیر طبیعی در سـرم افراد نرمال که توسـط آزمایشات مکرر به روش الایزا بدست آمده است به قرار زیر می‌باشد:

محدوده طبیعی : ۰/۶ – ۲/۲ ng/ml

خصوصیات کیت

1- حساسیت آنالیتیکال (حد تشخیص) :

برای تعیین حد تشـخیص ۲۰ مرتبه استاندارد صفر آزمایش شد. حد تشـخیص از ۲ انحراف معیار (SD) پایین‌تر از میانگین جذب در غلظت صفر بدسـت آمد. حد تشخیص برای این کیت ۰/۲ ng/ml بدست آمد.

2- دقت:

برای محاسـبه میزان دقت در یـک روز (درون سـنجی) و روزهای مختلـف، (میان سـنجی) آزمایش بر روی ۳ نمونه سـرم چندین بار تکرار شد که ضریب تغییرات به شرح ذیل است.

دقت درون سنجی				
نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
۱	۱۵	۰/۷۸	۰/۰۸	۹/۹
۲	۱۵	۱/۴۳	۰/۱۳	۹/۴
۳	۱۵	۳/۰۳	۰/۲۵	۸/۲

دقت میان سنجی				
نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
۱	۱۵	۰/۸۵	۰/۰۷	۸/۳
۲	۱۵	۱/۴۲	۰/۱۴	۹/۷
۳	۱۵	۳/۰۴	۰/۱۶	۵/۴

3- ویژگی:

واکنش متقاطع آنتی بادی‌های مونوکلونال مورد استفاده در این آزمایش برای سایر پروتئین‌ها بسیار پائین بدست آمد.

نوع ماده	غلظت	درصد تداخل
T4	۵۰۰ng/ml	۰/۱۲۸
rT3	۵۰۰ng/ml	۰/۰۶۴

4- خطی بودن:

سه نمونه مختلف سرمی با استاندارد صفر به نسبت‌های ۱:۲ ، ۱:۴ و ۱:۸ رقیق شـدند. سـپس غلظت T3 در آنها با اسـتفاده از کیت محاسبه شد که نتایج ذیل بدست آمد.

نمونه سرمی	غلظت اولیه (ng/ml)	درصد خطی بودن		
		۱:۲	۱:۴	۱:۸
۱	۱/۹	۱۰۵	۱۰۸	۱۰۹
۲	۳/۱	۱۰۲	۱۰۵	۱۰۹
۳	۴/۳	۹۵	۱۰۲	۱۰۶

+ References

1. American College of Physicians. Screening for thyroid disease. Ann Intern Med 1998; 129: 141-3.

2. Helfand M, Redfern CC. Screening for thyroid disease: an update. Ann Intern Med 1998; 129:144-58.

3. Karir T, Samuel G, Sivaprasad N, Meera V. Development of coated tubes RIA for serum T3 for production scale. J. Immunoassay & Immunochemistry 2005, 26, 77-87.

پاره‌ای نکات علمی در خصوص رفع مشـکلات احتمالی در کیت‌های الیزا :

	علت مشکل	راه حل
پایین بودن OD استانداردها و نمونه‌ها	افـت و یـا آلودگـی کونژوگه	تکـرار تسـت بـا کونژوگه جدید
	پاییـن بـودن دمـا و یا کوتـاه بـودن زمان انکوباسـیون، بـه دما نرسـیدن محلول‌های کیت و نمونه بیماران	• دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تسـت را تکرار کنید • قبل از شروع آزمایش کیت و نمونه بیماران به دمای اتاق برسد.
	PH نامناسـب و یـا غلظـت بـالای Wash Buffer، شستشـوی نامناسـب و یا خشـک شدن چاهک‌ها	• PH آب مقطـر را چک کنید و تسـت را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. • پـس از شستشـوی کامل و تخلیه چاهک‌هـا بلافاصله تست را ادامه دهید.
	نگهـداری نامناسـب کیـت و عـدم رعایت زنجیره سرد	• پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه‌کنید. • پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.

	طول موج خوانش نامناسب(۴۰۵ نانومتر بجای ۴۵۰ نانومتر)	• تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. • طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
عدم تولید رنگ در چاهک‌ها	استفاده از مواد سایر کیت‌ها	تکرار تست با مواد همان کیت
	انجام نشدن مرحله‌ای از تست	تکرار تست
	آلودگی محلول رنگزا	تکرار تست با محلول رنگزای جدید
	آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید	تکرار تست با محلول کونژوگه جدید
صحیح نبودن نمودار	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید

منحنی نبودن نمودار	پی‌پتینگ نامناسب	• استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف. • از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده‌کنید. • توجه کنید نوک سمپلر محکم به‌سمپلر متصل باشد. • توجه کنید در هنگام پی‌پتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود.
	PH نامناسب و یا غلظت بالای، Wash Buffer	PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید.
	شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها	پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید.

بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD	آلودگی استاندارد صفر	تکرار تست با استانداردهای جدید
	آلودگی محلول رنگزا	استفاده از محلول رنگزا جدید
	آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نا مناسب	• عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. • تمام سوزن‌های دستگاه واشر را چک کنید.
	طول موج نامناسب در خوانش	• تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. • طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. • از فیلتر ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید.

	آلودگی محلول Stop	تکرار تست با محلول Stop جدید
	ایجاد وقفه در خوانش	بلافاصله بعد از Stop کردن تست، یا حداکثر تا ۱۵ دقیقه پلیت را بخوانید.
عدم تکرار پذیری مناسب	پی‌پتینگ نامناسب	• استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف • از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید. • توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. • توجه کنید در هنگام پی‌پتینگ حباب وارد نشود. • توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد. • کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلرها.

عدم تکرار پذیری مناسب	طولانی شدن زمان انجام تست	فاصله زمانی بین اضافه کردن استانداردها و نمونه نباید بیشتر از ۱۰ دقیقه باشد. در این صورت نتایج قابل اعتماد نیست.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	• پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. • پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.
	باقی ماندن کونژوگه در لبه چاهک‌ها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها.	پیپتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	وجود حباب در چاهک‌ها	در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک‌ها نباشد.
	کثیف بودن کف چاهک‌ها	کف چاهک‌ها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید.
	مخلوط نشدن محلول‌های کیت	قبل از استفاده از ویال محلول‌ها را به آرامی تکان دهید.

خلاصه روش آزمایش

معرف‌ها	استانداردها	نمونه‌ها
استانداردها	۵۰µl	–
نمونه‌ها	–	۵۰µl
کونژوگه	۱۰۰µl	۱۰۰µl

در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه نمایید.

۵ بار با ۳۵۰µl محلول بافرشستشو رقیق شستشو دهید و با دقت محتویات را خالی کنید.

محلول رنگزا	۱۰۰µl	۱۰۰µl

به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی انکوبه نمایید.

محلول متوقف کننده	۵۰µl	۵۰µl

جـذب نوری هر چاهک در طول مـوج ۴۵۰ nm و فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm قرائت شود.

www.padyabteb.com

PADYABTEB
Producer of Diagnostic Products

دفتر فروش و خدمات پس از فروش:

تهران . خیابان شهید بهشتی . خیابان بخارست (احمد قصیر) . کوچه ۶ . پلاک ۵ . واحد ۵

تلفن فروش: ۸ ـ ۳۷۷۷۵۵۳۱ (۰۲۶) داخلی ۱۶۰ **خدمات پس از فروش:** ۰۹۱۲۹۴۰۹۱۲۴

کارخانه:

شهرک صنعتی اشتهارد . بلوار ابوریحان بیرونی . بلوار غزالی غربی . خیابان لادن ۲

تلفن: ۸ ـ ۳۷۷۷۵۵۳۱ (۰۲۶) **فکس:** ۳۷۷۷۵۵۲۹ (۰۲۶)

ISO 13485:2012

eztest
ELISA Kits