کیت سنجش هورمون Free T3 به روش الایزا

مقدمه :

هورمون T3 از غده تیروئید ترشح شده و حدود ۹۹/۷ درصد آن در خون بوسیله پروتئینهای حامل که شامل TBG، پره آلبومین (TBPA) و آلبومین می باشند حمل می گردد و در حدود ۰/۳ درصد از T3 به صورت آزاد و غیر متصل به پروتئینها می باشد 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 می باشد، اما به علت تغییر غلظت پروتئینهای حامل در بسیاری از تغییرات کلینیکی مانند حاملگی و مصرف داروها – مصرف قرصهای ضد بارداری – استروژن درمانی – مصرف فنی توئین و اندروژنها ، T3 کل دچار تغییرات کاذب می شود در حالیکه مقدار Free T3 ثابت است . بنابراین اندازه گیری Free T3 ارتباط قابل اعتمادتری با وضعیت کلینیکی بیمار در مقایسه با T3 کل نشان می دهد . به علاوه در بعضی از افراد مبتلا به هیپرتیروئیدیسم که مقدار TSH پایین و Free T4 در حد نرمال می باشد تعیین مقدار Free T3 در تشخیص کمک کننده می باشد .

اساس آزمایش :

کیت Free T3 با روش رقابتی و به کمک آنتی بادی مونوکلونال طراحی گردیده است، در این روش چاهکها توسط آنتی بادی منوکلونال که علیه مولکول T3 می باشد پوشش داده می شوند (Coating). استانداردها و نمونه بیماران با آنتی بادی پوشش داده شده در ته چاهکها مجاور می شود و پس ازانکوباسیون T3 که متصل به آنزیم HRP است به چاهکها اضافه می شود که این T3 کنژوگه (T3-HRP) با T3 نمونه ها در اتصال به آنتی بادیهای کوت شده در چاهکها رقابت می کند، بنابراین هر چه مقدار T3 در نمونه بیشتر باشد مقدار T3 کنژوگه کمتری به آنتی بادی های کوت شده متصل می گردد و بالعکس. پس از شستشو محلول رنگزا که حاوی هیدروژن پراکسید (H2O2) وکروموژن است به داخل چاهکها ریخته شده که بعد از انکوباسیون رنگ آبی پدید آمده به صورت معکوس با غلظت T3 موجود در نمونه ها متناسب است. برای جلوگیری از فعالیت بیش از اندازه و نامناسب آنزیم، محلول متوقف کننده افزوده می گردد که فعالیت آنزیم را مختل کرده و رنگ آبی را به زرد تبدیل می نماید که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد .

محتویات کیت :

۱) پلیت ۹۶ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد T3 (Anti-T3 Coated Plate) .
۲) محلول آنزیم کنژوگه (T3 Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۶ میلی لیتر محلول حاوی T3 کنژوگه شده با آنزیم HRP (آماده مصرف) .
۳) سری استاندارد (Standards Set) : ۶ ویال استاندارد شامل غلظتهای صفر ، ۲ ، ۴ ، ۸ ، ۱۲ و ۲۰ pg/ml از T3 (هر ویال استاندارد محتوی ۱ میلی لیتر می باشد) .
۴) سرم کنترل : یک ویال حاو ی ۱ میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال .
۵) محلول اسی بافر (Assay Buffer) : یک ویال حاوی ۶ میلی لیتر .
۶) محلول شستشو (Wash Solution) : یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۲۰X) جهت 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 مرحله ای (Chromogen-Substrate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر.
۹) برچسب مخصوص پلیت .

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند :

۱) دستگاه الایزاریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) .
۲) سمپلر های 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 HBsAg و آنتی بادی های ضد HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند، جهت احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش چهارم – اردیبهشت ۹۲

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 می باشد .
۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۸- ۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد .

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم یا پلاسما را می توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود، نمونه می تواند برای مدت دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود ولی برای نگهداری بیش از مدت دو روز باید از دمای ۲۰- درجه سانتی گراد استفاده گردد .

توضیحات عمومی :

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت 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 متوقف کننده، جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .
۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شود .
۶) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب ، زمان انکوباسیون مناسب می باشد ، بنابراین پیشنهاد می گردد 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 می شود .
۷) به دلیل مشابه در بند ۶ بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه ها بیش از ۵ دقیقه بطول نیانجامد .

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 می گردد که از استانداردها و نمونه ها بصورت داپلیکیت استفاده شود بدین معنی که هر استاندارد و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید، سپس۵۰ میکرولیترازمحلول اسی بافر (Assay Bufefer)را داخل هر چاهک بریزید .
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 درجه حرارت اتاق انکوبه نمایید .
۴) ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه 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 درجه حرارت 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 می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد، در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو را در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها 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 substrte) به هر چاهک اضافه نمایید .
۸) چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید .
۹) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزاریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نمایید (توصیه میشود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد) .

محاسبه نتایج :

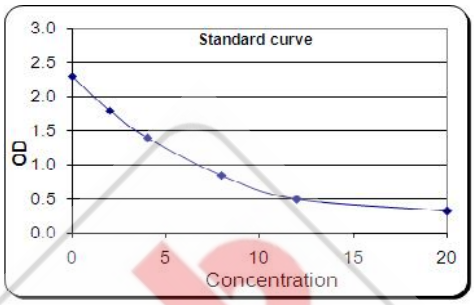
از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm میتوان استفاده نمود .
۱) جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش چهارم – اردیبهشت ۹۲

۲) 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 بدست آورید ، سپس نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی بدست آید .

۳) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن راپیدا کنید، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید بطوریکه 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 .

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



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

مقادیر مورد انتظار:

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

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

شاخصهای اجرایی :

۱) حداقل مقدار قابل اندازه گیری :

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و منهای سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت Free T3 قابل تشخیص در این کیت pg/ml ۰/۵ می باشد .

۲) دقت آزمایش :

آزمایشهای اینترا – اسی (همخوانی غلظت مشخص ازیک نمونه در یک سری آزمایش) و اینتر– اسی (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 :

جدول شماره۱ (اینترا– اسی) :

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

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش چهارم – اردیبهشت ۹۲

جدول شماره ۲ (اینتر- اسی) :

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 بصورت دوپلیکیت 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 که نتایج آن در جدول زیر آمده است :

جدول 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

٤) اختصاصیت آزمایش :

اختصاصیت این آزمایش به کمک سرمهایی با غلظتهای مختلف L-thyroxine , Diiodothyronine , Diiodothyrosine , Phenylbutazone , Iodothyrosine و Sodium Salicylate جهت بررسی واکنشهای متقاطع FT3 با بررسی شد که نتایج آن در جدول زیر آمده است :

جدول اختصاصیت (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

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱٤۹٤۷۳٤٤٦۳
تلفن ٤۲۱۹۷۰۰۰ فکس ٤۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش چهارم – اردیبهشت ۹۲

References :

1. Barker, S.B., "Determination of Protein Bound Iodine." Journal of Biological Chemistry, 173, 175, (1948).
2. Chopra, I.J., Solomon, D.H., and Ho, R.S., "A Radioimmunoassay of Triiodothyronine," J. Clinical Endocrinol, 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).

روش انجام آزمایش Free T3 بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی بادی ضد T3			
محلولها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
استانداردها	۵۰ میکرولیتر	–	–
سرم کنترل	–	۵۰ میکرولیتر	–
نمونه	–	–	۵۰ میکرولیتر
اسی بافر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر
پلیت را به ملایمت برای مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهکها بخوبی مخلوط شوند سپس دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید .			
آنزیم کنژوگه	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر
پلیت را به ملایمت برای مدت ۱۵ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهکها بخوبی مخلوط شوند سپس دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . 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 .			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید .			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را با طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید .			

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

ویرایش چهارم – اردیبهشت ۹۲