

کیت سنجش هورمون T3 به روش الایزا

مقدمه :

T3 همانند T4 در غده تیروئید ساخته می شود ، البته فقط ۲۰٪ T3 موجود در خون در تیروئید ساخته می شود و ۸۰٪ دیگر از تجزیه T4 در بافتها ساخته می شود. قابل ذکر است که مقدار آزاد این هورمون نیز در خون بسیار کم بوده (۰/۳٪) که می تواند به داخل بافتها وارد شده و اثر خود را اعمال کند و بقیه این هورمون بصورت متصل با پروتئینهاست که اصلی ترین این پروتئینها، تیروکسین بایندینگ گلوبولین (TBG) و آلبومین می باشند، T3 در سوخت و ساز سلولی بسیار موثر بوده و در رشد بدن و همچنین رشد و تمایز اعضاء جنسی نقش اساسی دارد. اندازه گیری Total T3 یک فاکتور مهم در بررسی اختلالات تیروئید بخصوص در هیپرتیروئیدیسم بشمار می رود. تقریباً در ۵ تا ۱۰٪ افراد مبتلا به هیپرتیروئیدیسم تیر T3 فاکتور بسیار ارزشمندی در بررسی عملکرد تیروئید نسبت به سایر آزمایشات می باشد. کیت حاضر قابلیت اندازه گیری و تیراسیون هورمون T3 را با اختصاصیت و حساسیت بسیار بالا دارا می باشد .

اساس آزمایش :

کیت T3 حاضر به روش رقابتی و به کمک آنتی بادی مونوکلونال طراحی گردیده است . در این روش چاهکها توسط آنتی بادی مونوکلونال که بر 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 شوند و پس از انکوباسیون، T3 که متصل به آنزیم HRP است به چاهکها اضافه می شود که این T3 کنژوگ (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 کنژوگ کمتری به آنتی بادی های کوت شده متصل می گردد و بالعکس . پس از شستشو ، محلول رنگزا که محتوی هیدروژن پراکسید (H2O2) و کروموزن است به داخل چاهکها ریخته شده و انکوبه می گردد 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 کنژوگ (T3 Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۶ میلی لیتر محلول حاوی T3 کنژوگ شده با آنزیم HRP (آماده مصرف) .
- ۳) سری استاندارد (Standard Set) : ۶ ویال استاندارد شامل غلظتهای صفر، ۰/۵ ، ۱ ، ۲/۵ ، ۵ و ۱۰ ng/ml از T3 (هر ویال استاندارد حاوی ۱ میلی لیتر می باشد) .
- ۴) محلول اسی بافر (Assay Buffer) : یک ویال حاوی ۶ میلی لیتر .
- ۵) سرم کنترل : یک ویال حاوی ۱ میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال .
- ۶) محلول شستشو: 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 اسید کلریدریک ۱ نرمال .
- ۹) برچسب مخصوص پلیت .

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

- ۱) دستگاه الایزایدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس).
- ۲) سمپلر های ۵۰ و ۱۰۰ میکرو لیتر دقیق .
- ۳) آب مقطر .

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

- ۱) محتویات این کیت فقط برای مصرف در همین کیت می باشد .
- ۲) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خوداری 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 .

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 و یا برای مدت طولانی تر (حداکثر تا ۳۰ روز) در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شود . در ضمن باید از Freeze – thaw نمودن نمونه پرهیز شود .

توضیحات عمومی :

- (۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاقی 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 شوند .
- (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 دایلیکیت 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، سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول اسی بافر (Assay buffer) را به 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 و در تاریکی 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 و در تاریکی انکوبه نمایید .
- (۶) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشوید (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 شستشود حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو 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-Substrate) 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 توقف دهنده (Stop Solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید . برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الیزاریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نمایید (توصیه میشود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد).

محاسبه نتایج :

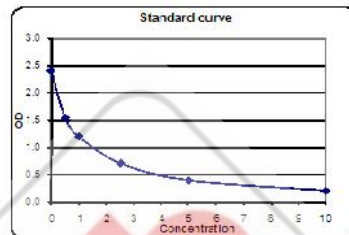
از هر دستگاه الیزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm میتوان استفاده نمود .

۱) جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید .

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 را پیدا 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 .

استانداردها (ng/ml)	جذب نوری
0	2.4
0.5	1.55
1	1.2
2.5	0.7
5	0.4
10	0.2



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

محدوده طبیعی ng/ml	میانگین محدوده طبیعی ng/ml
۰/۶ - ۲/۱	۱/۴

$$\begin{aligned}
 \text{ng/ml} \times 100 &= \text{ng/dl} \\
 \text{ng/ml} \times 1.536 &= \text{nmol/L} \\
 \text{nmol/L} \times 0.651 &= \text{ng/ml}
 \end{aligned}$$

شاخصهای اجرایی :

۱) حداقل مقدار قابل اندازه گیری :

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و منهای سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت T3 قابل تشخیص در این کیت ۰/۱ ng/ml می باشد .

۲) دقت آزمایش :

آزمایشهای اینترا-اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و اینترا-اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایشات مختلف) با استفاده از ۳ سرم با غلظتهای مختلف T3 انجام گردید که در جداول ۱ و ۲ آمده است :

جدول شماره ۱ (اینتر-اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (ng/ml)	SD	CV%
۱	۲۴	۰/۵۳	۰/۰۲	۳/۸
۲	۲۴	۱/۶۳	۰/۰۵	۳/۱
۳	۲۴	۵/۴۵	۰/۱۷	۳/۱

جدول شماره ۲ (اینتر-اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (ng/ml)	SD	CV%
۱	۱۰	۰/۵۷	۰/۰۵	۸/۸
۲	۱۰	۱/۶۶	۰/۰۶	۳/۶
۳	۱۰	۵/۶۵	۰/۲۸	۴/۹

۳) اختصاصیت آزمایش :

اختصاصیت این آزمایش به کمک سرم‌هایی با غلظت‌های مختلف L-thyroxine , Diiodothyronine , Diiodothyrosine , Phenylbutazone , Iodothyrosine و Sodium Salicylate جهت بررسی واکنش‌های متقاطع با T3 بررسی شد که نتایج آن در جدول زیر آمده است:

غلظت ظاهری T3 (ng/ml)	غلظت (μg/ml)	آنالیت
<۰/۱	۱۰	Iodothyrosine
<۰/۱	۱۰	Phenylbutazone
<۰/۱	۱۰	Sodium Salicylate
<۰/۱	۱۰	Diiodothyronine
<۰/۱	۱۰	Diiodothyrosine
<۰/۱	۱۰	L-thyroxine

۴) ریکاوری آزمایش :

مقادیر معلومی از T3 به ۴ نمونه سرم با غلظت‌های مشخص T3 افزوده شده و ریکاوری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول آمده است .

نمونه	مقدار T3 موجود در نمونه (ng/ml)	مقدار افزوده شده T3 (ng/ml)	مقدار مورد انتظار (ng/ml)	مقدار بدست آمده (ng/ml)	ریکاوری (%)
۱	۰/۶	۱	۰/۸	۰/۸	۱۰۰
۱	۰/۶	۵	۲/۸	۲/۶	۹۳
۱	۰/۶	۱۰	۵/۳	۵/۱	۹۶
۲	۱/۶	۱	۱/۳	۱/۴	۱۰۷
۲	۱/۶	۵	۳/۳	۳/۱	۹۴
۲	۱/۶	۱۰	۵/۸	۶/۳	۱۰۹
۳	۲/۴	۱	۱/۷	۱/۵۵	۹۱
۳	۲/۴	۵	۳/۷	۴/۱	۱۱۱
۳	۲/۴	۱۰	۶/۲	۵/۷	۹۲
۴	۳/۸	۱	۲/۴	۲/۶	۱۰۸
۴	۳/۸	۵	۴/۴	۴/۱	۹۳
۴	۳/۸	۱۰	۶/۹	۶/۵	۹۴

خطی بودن آزمایش :

با استفاده از استاندارد صفر، رفتهای متوالی از ۴ نمونه سرم با غلظت مشخص از T3 تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت محاسبه شد که در جدول زیر نتایج آن آورده شده است .

نمونه	مقدار T3 موجود در سرم رقیق نشده (ng/ml)	ریکاوری (%)			
		رقت ۱/۲	رقت ۱/۴	رقت ۱/۸	رقت ۱/۱۶
۱	۱/۴	۱۰۳	۹۷	۱۰۸	-
۲	۲/۹	۹۲	۹۵	۱۰۹	۱۰۱
۳	۴/۸	۱۰۰	۱۱۱	۸۹	۸۷
۴	۷/۸	۱۰۰	۱۰۵	۱۰۹	۱۱۱

References :

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

روش انجام آزمایش T3 بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی بادی جهت تست T3			
محلونها	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 و سپس دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید .			
آنزیم کنژوگه	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر
پلیت را به ملایمت برای مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهکها بخوبی مخلوط شوند و سپس دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی 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 .			