کیت ایمونو آنزیماتیک (EIA) پادتن علم

T3

☐ ۹۶ تستی ☐ ۱۹۲ تستی

موارد استفاده :
تعیین کمّی T3 در سرم یا پلاسما

I. مقدمه :

هورمون تری یدوتیرونین یا T3 که تقریباً ۵٪ از هورمونهای تیروئیدی سرم را تشکیل می دهد، نقش حیاتی در حفظ Euthyroidism ایفا می کند. ۸۰٪ این هورمون در اثر Deiodination تیروکسین در کبد ایجاد شده و مابقی مستقیماً از غده تیروئید ترشح می گردد[۱-۴].

بیش از ۹۹/۹۵٪ T3 سرم به پروتئینهای حامل پلاسما متصل است. ۸۰٪ از T3 سرمی به globulin Thyroxine binding ، ۱۰٪ به Thyroxine binding Prealbumin و ۱۰٪ باقیمانده به Albumin وصل است. در نتیجه فقط کمتر از ۰/۵٪ از کل T3 آزاد بوده و فعالیت متابولیکی دارد [۵-۶].

در افراد سالم ظرفیت اتصالی T3 غالباً ثابت باقی می ماند، ولی در دوران حاملگی، هیپر پروتئینمی، بیماریهای وراثتی با میزان TBG بالا، مصرف استروژن یا مصرف داروهای ضد بارداری این ظرفیت پائین تر بوده و در نتیجه میزان T3 به طور کاذب بالاتر می باشد. در موارد TBG پائین (هیپو پروتئینمی، آکرومگالی، بیماریهای کلیوی، کبدی و گوارشی و نیز بدخیمی ها)میزان T3 به طور کاذب پائین تر است[۷-۸].

در صورت نرمال بودن TBG، اندازه گیری مقدار T3 در ارزیابی عملکرد تیروئید مفید می باشد. در هیپوتیروئیدیسم پیشرفته غلظت T3 غالباً پائین بوده و در هیپرتیروئیدیسم غلظت آن بالا است. اندازه گیری T3 خصوصاً در تشخیص Thyrotoxicosis که غلظت T3 سرمی بالا بوده و غلظت T4 سرمی نرمال است، تعیین کننده می باشد[۹].

II. اصول اندازه گیری :

کیت اندازه‌گیری کمّی T3 بر مبنای سنجش واکنش رقابتی ایمونوآنزیماتیک بر روی فاز جامد طراحی شده است. در این سیستم، نمونه بیمار و مقدار ثابتی از T3 متصل به آنزیم پراکسیداز (HRP) به حفره های پلی استایرن پوشیده شده با آنتی بادی‌های ضد T3 افزوده می‌شود. در حین انکوباسیون اول، T3 موجود در سرم بیمار با T3-HRP برای تشکیل پیوند با آنتی بادی های ضد T3 وارد رقابت می شود. در نتیجه مقدار T3-HRP متصل به Ab-T3 با میزان T3 موجود در سرم نسبت معکوس دارد. پس از انکوباسیون مقادیر اضافی T3-HRP و T3 موجود در سرم از طریق شستشو از سیستم خارج می‌شوند. سپس افزودن سوبسترای TMB (۳و ۳′-۵ و ۵′ تترامتیل بنزیدین) سبب ایجاد رنگ آبی توسط آنزیم می شود. شدت رنگ ایجاد شده با میزان T3 موجود در نمونه‌ها نسبت عکس دارد. رنگ‌زائی واکنش آنزیماتیک توسط محلول متوقف کننده خاتمه می یابد و رنگ آبی ایجاد شده به رنگ زرد مبدل می‌شود. شدت رنگ به وسیله یک اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. برای تعیین غلظت T3 نمونه‌ها ابتدا منحنی جذب نور استانداردها برحسب غلظت T3 آنها رسم شده و سپس میزان غلظت T3 نمونه ها از روی منحنی استاندارد تعیین می‌گردد.

III. محتویات کیت :

تاریخ انقضا بر روی اجزاء کیت (Cat.No.P-T3) درج شده است .
دمای مناسب برای نگهداری کیت ۸-۲ درجه سانتی گراد می باشد .

محتویات کیت ۹۶ تستی:

۱. **پلیت:** پلیت ۹۶ حفره ای پوشش داده شده با آنتی بادی های پلی کلنال ضد T3 خرگوش.

۲. **استانداردها :** ۶ ویال ۱ میلی لیتری استاندارد T3 حاوی سرم انسان. غلظت دقیق T3 استانداردها بر روی برچسب آنها درج شده است.

۳. **کنترل های سرمی :** ۲ ویال ۱ میلی لیتری سرم کنترل حاوی T3 و سرم انسانی. غلظت دقیق T3 کنترل ها بر روی برچسب آن ها درج شده است .

۴. **ردیاب آنزیمی :** یک ویال ۱۲ میلی لیتری T3 متصل به پراکسیداز (HRP) محلول در بافر، حاوی پروتئین و تیمروزال.

۵. **محلول شستشو غلیظ)x۲۰(:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری PBS-Tween20 و تیمروزال.

۶. **محلول رنگ زا :** یک ویال ۱۲ میلی لیتری بافر H_2O_2 و TMB.

۷. **محلول متوقف کننده واکنش :** یک ویال ۱۲ میلی لیتری H_2SO_4 دو نرمال.

محتویات کیت ۱۹۲ تستی:

۱. **پلیت:** دو پلیت ۹۶ حفره ای پوشش داده شده با آنتی بادی های پلی کلنال ضد T3 خرگوش .

۲. **استانداردها :** ۶ ویال ۱ میلی لیتری استاندارد T3 حاوی سرم انسان. غلظت دقیق T3 استانداردها بر روی برچسب آنها درج شده است.

۳. **کنترل های سرمی :** ۲ ویال ۱ میلی لیتری سرم کنترل حاوی T3 و سرم انسانی. غلظت دقیق T3 کنترل ها بر روی برچسب آن ها درج شده است .

۴. **ردیاب آنزیمی :** یک ویال ۲۵ میلی لیتری T3 متصل به پراکسیداز (HRP) محلول در بافر، حاوی پروتئین و تیمروزال.

۵. **محلول شستشو غلیظ)x۲۰(:** یک ویال ۲۵ میلی لیتری PBS-Tween20 و تیمروزال.

۶. **محلول رنگ زا :** یک ویال ۲۵ میلی لیتری بافر H_2O_2 و TMB.

۷. **محلول متوقف کننده واکنش :** یک ویال ۲۵ میلی لیتری H_2SO_4 دو نرمال.

IV. وسایل مورد نیاز (این وسایل همراه کیت عرضه نمی شوند):

۱. دستگاه اسپکتروفتومتر میکروپلیت با دامنه جذب نوری ۳-۰ در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر .

۲. میکروپیپت قابل تنظیم بر روی ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر و تیپ های یک بار مصرف.

۳. آب مقطر یا آب دیونیزه برای رقیق کردن محلول شستشو .

V. نحوه جمع آوری و آماده سازی نمونه ها:

نمونه مناسب جهت اندازه گیری T3، سرم یا پلاسمای هپارینه بیمار می باشد. این نمونه ها به مدت یک هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری است . برای نگهداری نمونه ها به مدت طولانی تر ، سرم یا پلاسمای بیمار را در حجم های کم تقسیم نموده ، در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری نمائید . بهتر است از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه ها اجتناب نمود . برای اندازه گیری T3 نمونه های منجمد شده ، ابتدا نمونه را در حرارت اتاق ذوب نموده ، سپس با حرکت دست یکنواخت نمائید . برای یکنواخت کردن نمونه ها از Vortex نباید استفاده نمود. برای اندازه گیری دقیق نمونه هائی که میزان T3 آنها بیش از آخرین استاندارد است ، ابتدا نمونه ها را با سرم انسانی(با غلظت کمتر از ۰/۵ ng/ml) رقیق کرده ، سپس اندازه گیری مجدد بعمل آورید . بدیهی است در محاسبه نتایج این نمونه ها ، ضریب رقت منظور می شود .

VI. روش کار :

قبل از شروع کار دمای تمامی محلولها باید به دمای اتاق برسد.

محلول شستشوی غلیظ به نسبت یک به بیست با آب مقطر یا دیونیزه رقیق شود. (یک حجم محلول شستشوی غلیظ به ازاء ۱۹ حجم آب) محلول شستشوی رقیق را تا یک هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد می‌توان نگهداری کرد.در صورت مشاهده کریستال در محلول غلیظ شستشو ، ویال را به مدت چند دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید تا محلول یکنواخت گردد.

۱. ابتدا ۵۰ میکرولیتر از استانداردها، سرم کنترل ها و سرم بیماران را در حفره های مربوطه ریخته ، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه T3 را به حفره های مربوطه اضافه نمائید.

۲. محتویات پلیت را به مدت ۱ دقیقه بر روی میز تکان داده و به خوبی مخلوط نمائید (پلیت را از دو طرف با حفظ زمان برابر تکان دهید).

۳. پلیت را با برچسب مخصوص پوشانده و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق **24±3°C** قرار دهید.

۴. حفره ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرو لیتر محلول شستشو بشوئید .

۵. به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای TMB اضافه نمائید.

۶. پلیت را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و در محلی تاریک قرار دهید .

۷. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش را در هر حفره بریزید و به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط کنید .

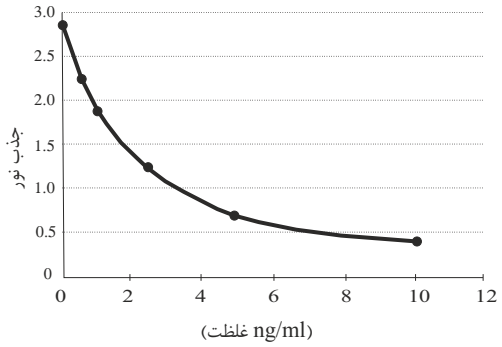
۸. میزان جذب نوری حفره ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده ، بخوانید.

VII. محاسبه نتایج :

پس از تعیین میزان جذب نوری استانداردها و نمونه ها و ترسیم منحنی، غلظت T3 بیماران قابل محاسبه است . در منحنی که با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (قابل برنامه ریزی) و یا به صورت دستی ترسیم می شود، محور Y شاخص میزان جذب نور استانداردهای T3 در طول موج ۴۵۰ نانومتر و محور X شاخص غلظت استانداردهای T3 برحسب ng/ml می باشد . نتایجی که در جدول زیر آمده ، فقط به عنوان مثال بوده و نبایستی بعنوان نتایج حاصل از آزمایش تلقی شود.

غلظت T3 (ng/ml)	جذب نور	نمونه
۰/۰	۲/۸۲	استاندارد A
۰/۵	۲/۲۵	استاندارد B
۱/۰	۱/۸۸	استاندارد C
۲/۵	۱/۲۳	استاندارد D
۵/۰	۰/۷۴	استاندارد E
۱۰/۰	۰/۴۳	استاندارد F
۱/۲	۱/۷۷	سرم

برای ترسیم منحنی از غلظت های مندرج بر روی ویال استانداردها استفاده نمائید.



VIII. مقادیر طبیعی:

با استفاده از سرم ۱۹۵ فرد سالم بالغ، مقادیر طبیعی T3 توسط کیت پادتن علم تعیین گردیده است. نتایج بدست آمده از این آزمایشات نشان می دهد که غلظت T3 ۹۵٪از این افراد بین ۰/۷ng/ml تا ۲/۰ng/ml با میانگین ۱/۳ng/ml می باشد[۱۰].

توصیه می گردد هر آزمایشگاه با در نظر گرفتن غلظت سرمی T3 افراد سالم، دامنه طبیعی آن را تعیین نموده و ازآن به عنوان مبنای مقایسه خود استفاده نماید.

IX. ویژگی های اختصاصی تست:

۱. **حساسیت:** حداقل غلظت T3 قابل اندازه گیری با این کیت ۰/۲ng/ml است.

۲. **اختصاصی بودن:** اختصاصی بودن کیت T3 پادتن علم با تعیین درصد تداخل پس از افزودن مواد مندرج در جدول زیر تعیین گردیده است. درصد تداخل نسبت غلظت T3 به غلظت ماده افزوده شده که جایگزین ۵۰٪ از T3-HRP در واکنش بین پیوند T3-HRP و Ab anti T3 گردد، می باشد.

نتایج درصد تداخل به شرح زیر می باشد.

ماده افزوده شده	درصد تداخل (Cross-reactivity)
L-Triiodothyronine	۱۰۰
D-Triiodothyronine	۱۰۰
L-Thyroxine	۰/۳
D-Thyroxine	۰/۴
3,5-Diiodo-L-Thyronine	۰/۰۱<
Mono iiodothyrosine	۰/۰۱<
3,3,5-Triiodothyronine acid	۰/۳

۳. **مقایسه با روش الکتروکمی لومینسانس T3:** برای بررسی همبستگی آماری بین کیت EIA پادتن علم و کیت Roche Elecsys، غلظت T3، ۱۰۰۰ نمونه تصادفی با هر دو کیت اندازه گیری شد. مقایسه نتایج به دست آمده، ضریب همبستگی ۰/۹۵ را نشان می دهد.

۴. **دقت:** شاخص دقت کیت با مقایسه تکرارپذیری جواب ها به روش میان‌سنجی (Inter-assay) و درون‌سنجی (Intra-assay) تعیین گردیده است. برای این منظور ۳ نمونه سرم (Low,Normal,High) ده بار در یک دوره آزمایش (درون‌سنجی) و یکبار در ده دوره آزمایش متفاوت (میان‌سنجی) تعیین غلظت شده است. نتایج انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات (CV) در جدول زیر آمده است:

جدول شاخص دقت

سرم	میان سنجی			درون سنجی		
	میانگین(ng/ml)	SD	%CV	میانگین(ng/ml)	SD	%CV
Low	۰/۸	۰/۰۶	۷/۵	۰/۶	۰/۰۴	۷/۳
Normal	۱/۵	۰/۱۹	۱۲/۶	۱/۲	۰/۱۶	۱۳/۲
High	۳/۹	۰/۲۳	۶/۰	۵/۲	۰/۳۴	۶/۵

۵. **بررسی رقت:** برای بررسی خطی بودن رقتهای T3 چندین نمونه سرمی غلیظ پس از رقیق شدن متوالی با سرم انسانی که غلظت T3 آن کمتر از ۰/۴ ng/ml بوده، اندازه گیری شده است. نتایج بدست آمده از رقت ۲ نمونه سرمی در جدول زیر آمده است.

جدول رقت

رقت		رقیق نشده	۱:۲	۱:۴	۱:۸
غلظت پیش بینی شده	S1	۸/۸	۴/۴	۲/۲	۱/۱
	S2	۶/۵	۳/۲	۱/۶	۰/۸
غلظت اندازه گیری	S1	۸/۸	۴/۳	۲/۵	۱/۳
	S2	۶/۵	۳/۱	۱/۴	۰/۷
٪ ریکاوری	S1	-	۹۷	۱۱۳	۱۱۸
	S2	-	۹۷	۸۸	۸۸

X.References

1.ELLIS, S.M.and EKINS, R.P. The radioimmunoassay of serum free triiodothyronine and thyroxine pp.187-194 In Radioimmunoassay in Clinical Biochemistry, edited by C.A. Pasternak, New York, Heyden,1975,299pp

2.PETERSEN, B. A., GIESE, R. W., LARSEN. P.R. and KARGER, B. L. Measurement of free thyroid hormones in serum by dialysis and gas chromatography. Clinical Chemistry, vol.23,pp.1389-1396, 1977.

۳.LARSEN, P.R. Triiodothyronine: review of recent studies of its physiology and pathophysiology in man. Metabolism, vol.21, pp. 1073-1092.1972.

۴.CAVALIERI. R. R. and PAPOPORT. B. Impaired peripheral conversion of thyroxine to triiodothyronine. Annual Review Medicine, vol. 28, pp. 57-65,1977.

۵.REFETOFF S. Thyroid Hormone transport. Endocrinology. Philadelphia: Grune and Stratton, 1979; 1:347-56.

۶.ROBBINS J, JOHNSON ML. Theoretical considerations in the transport of thyroid hormones in blood. In: Ekins RP, editor. Free thyroid hormones. Amsterdam: Excerpta Medica, 1979:1-16

۷.SLAG MF, MORLEY JE, ELSON MK, ETAL. Hypothyroxinemia in critically ill patients as a predictor of high mortality. JAMA 1981;245:43-5.

۸.WALFISH PG Thyroid physiology and pathology. In: Collu R Jr, Ducharme H, Guyda, editors. Pediatric endocrinology. New York: Raven Press, 1981:357-31.

۹.HOLLANDER, C.S., STEVENSON,C" MITSUMA, T., PINEDA, G, SHENKMAN, L. and SILVA, E. T3 toxicosis in an iodine-deficient area. Lancet, vol.2,pp.1276-1278,1972.

۱۰.BURTIS, C, A, ASHWOOD, E. R. Tletz fundamentals of clinical chemistry 4th edition: 789,1999.

توجه:

رعایت مدت زمان تکان دادن چاهکها (بعد از اضافه نمودن محلول کونژوگه) در کسب نتیجه مطلوب نقش مهمی دارد، لذا خواهشمند است ضمن رعایت آن ، از یکنواخت بودن محلول چاهکها اطمینان حاصل فرمائید.

احتیاط!

با توجه به اینکه محلول‌های به‌کار رفته در این کیت‌ها حاوی مواد سمی مانند تیمروزال و مواد پروتئینی با منشا انسانی و حیوانی هستند، و اینکه با هیچ تستی نمی توان از عدم وجود ویروس‌هایی چون HCV ، HBV، HIV در این محلول‌ها اطمینان کامل حاصل کرد، خواهشمند است هنگام کار احتیاط‌های لازم از جمله استفاده از دستکش، امتناع از خوردن و آشامیدن و سیگار کشیدن، خودداری از پیپت کردن با دهان و پرهیز از هرگونه تماس محلول با چشم و دست‌ها، رعایت شود.

Rev: Jul 2020

تهران ۱۴۱۶۸، خیابان طالقانی غربی، خیابان سرپرست(کیوان جنوبی)، پلاک ۲۶
تلفن و فکس : ۶۳۴۸۱(۰۲۱)