

مقدمه:

T3 از غده تیروئید ترشح می شود ، وزن مولکولی آن 651 دالتون است و درخون با اتصالات ضعیف به پروتئین های حامل پلازما مثل TBG و پره آلبومین (TBPA) و آلبومین وصل می شود. مقدار T3 در خون خیلی کمتر از T4 می باشد. حلالیت کم T3 سبب می شود تا بخش عمده آن یعنی حدود 99.5 درصد به پروتئین های حامل متصل گردد. T3 در سوخت و ساز سلولی بسیار موثر بوده و در رشد بدن و همینطور رشد و تمایز اندام های جنسی نقش اساسی دارد. تولید T3 با مکانیسم فیدبک منفی توسط تیروتروپین (TSH) کنترل می شود که خود TSH توسط TRH مترشحه از هیپوتالاموس کنترل می شود. نیمه عمر T3 ، 24-30 ساعت است. T3 و T4 در کبد به فرم های سولفات گلوکورونه کنژوگه می شوند که این کنژوگه ها داخل صفرا شده و به روده می روند. هورمون های تیروئیدی هیدرولیز شده بعدا دوباره جذب میشوند. سلول های تیروئید پد پلاسمانی را به Iodine تبدیل کرده و سپس Iodine را روی آمینو اسید تیروزین مولکول تیرو گلوبولین در موقعیت های 3 و 5 قرار می دهند که منجر به ساخته شدن (MIT, DIT) می شود که از لحاظ بیولوژیک غیر فعالند. ترکیب دو مولکول 3- منویدوتیروزین و 3 و 5- دی یدوتیروزین T3 را می سازد.

کاربرد بالینی آزمایش:

سنجش T3 جهت تأیید علائم بالینی موجود در هیپرتیروئیدیسم کمک می کند. در اکثر موارد هیپرتیروئیدی میزان T3 و T4 تواماً بالاست ولی در بعضی موارد مثل Tirotoxicosis غلظت T3 به تنهایی بالا بوده در حالی که T4 و TBG نرمال هستند. در ندول های تیروئید و آدنوم توکسیک پلامر، میزان T3 بالا می رود. در هیپرتیروئیدیسم پیشرفته غالباً میزان T3 پائین می آید و در گواتر به علت کمبود ید نیز میزان آن کاهش می یابد.

محدوده طبیعی:

مقادیر نرمال T3 در سرم افراد طبیعی که توسط تست های مکرر الیزا بدست آمده بقرار زیر می باشد ولی پیشنهاد می گردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد:

محدوده طبیعی ng/ml	میانگین محدوده طبیعی ng/ml
0.5 - 2.1	1.3

اساس آزمایش :

اساس این کیت به روش رقابتی می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادی منوکلونال بر علیه یک واحد آنتی ژنیک T3 ، Coat میشوند. استاندارد ها و نمونه بیمارار با آنتی بادی Coat شده در چاهکها مجاور می شود و سپس محلول (assay buffer) اسی با فرو پس از انکوئاسیون کنژوگه T3 به چاهکها اضافه میشوند که این T3 کنژوگه با T3 موجود در نمونه در اتصال به آنتی بادی های 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. در ادامه پس از شستشو ، محلول رنگزا که حاوی H2O2 و کروموزن است به داخل چاهکها ریخته میشود و تولید رنگ آبی می کند که رنگ آبی تولید شده به صورت معکوس با غلظت T3 موجود در نمونه ها متناسب است. با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل میشود که بهترین جذب نوری را در طول موج 450 نانومتر دارد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

نمونه سرم ارجح است ولی از پلاسمای هپارینه یا همراه با EDTA هم استفاده کرد ، سرم T3 خیلی پایدار است و می تواند به مدت 7 روز در دمای اتاق و یا برای مدت طولانی تر در یخچال و 20- نگهداری شود (حد اکثر تا 30 روز). از فریز و ذوب کردن نمونه باید اجتناب کرد.

واکنش تداخلی:

داروهای آمیودارون ، اسپرین ، دانازول ، پروپرانولول بالا برنده T3 هستند و آنتی ایپی لپسی ها (ضد صرع ها) مثل فنی توئین و کاربامازین پائین آورنده اند.

محتویات کیت :

- 1- یک عدد پلیت حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد T3 (Anti -T3 coated Plate) دارای 96 چاهک
- 2- سری استاندارد (Standard Set) : 6 ویال استاندارد دارای غلظت های ng/ml صفر ، 0.5 ، 1 ، 2 ، 4 ، 8 که هر ویال محتوی 1 میلی لیتر می باشد.
- 3- سرم کنترل (Control Serum) : یک ویال حاوی 1 میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص نوشته شده روی برچسب ویال
- 4- محلول رقیق کننده نمونه ها (Sample Diluent) : یک ویال حاوی 1 میلی لیتر برای رقیق کردن نمونه هایی که غلظت بالاتری از بالاترین استاندارد کیت را دارا می باشند.
- 5- محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی 6 میلی لیتر محلول حاوی T3 کنژوگه شده با HRP .
- 6- محلول اسی بافر (Assay Buffer) : یک ویال حاوی 6 میلی لیتر محلول.
- 7- محلول شستشو (Washing Solution) : یک ویال حاوی 40 میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (25 X) که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف مقدار لازم از محلول شستشوی غلیظ را به نسبت 1/25 با آب مقطر رقیق کنید.
- 8- محلول رنگزا (Chromogen Substrate) : یک ویال محتوی 12 میلی لیتر و آماده برای مصرف.
- 9- محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال محتوی 12 میلی لیتر.
- 10- بر چسب مخصوص پلیت (Card Board Sealer)

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

- 1- دستگاه خوانش الیزا (Eliza Reader) دارای فیلتر 450 نانومتر و در صورت امکان 630 به عنوان فیلتر رفرانس.
- 2- سمپلر های 50 و 100 میکرولیتر دقیق
- 3- آب مقطر

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

- 1- محتویات این کیت برای مصرف در همین کیت می باشد .
- 2- از مخلوط کردن محتویات کیتها باشماره ساختهای مختلف جدا" خودداری نمائید .
- 3- کلیه مواد موجود در کیت که منشأ سرمی دارند از نظر وجود HIV, HCV, HBs AG کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند . جهت احتیاط بهتر است هر کاربری که با کیت کار می کند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزد .

توضیحات عمومی:

- 1- قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق رسانده و به خوبی تکان دهید تا کاملاً" یکنواخت شوند.
- 2- بهتر است به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند .
- 3- از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید .
- 4- پس از افزودن محلول متوقف کننده ، جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .
- 5- برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند .
- 6- از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب ، زمان انکو باسیون مناسب می باشد ، بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و در محلولهای مورد نیاز را باز کنید ، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیقتری میشود .
- 7- بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه ها پیش از 5 دقیقه به طول نیانجامد .

مراحل انجام آزمایش :

- 1- تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب نموده و باقی چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .
- 2- 50 میکرولیتر از هر استاندارد ، سرم کنترل و نمونه را به داخل هر چاهک بریزید ، سپس پلیت را به آرامی به مدت 15 ثانیه تکان دهید تا محتویات آن بخوبی مخلوط شوند ، پیشنهاد می گردد که از استانداردها و نمونه ها به صورت 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 سپس 50 میکرولیتر محلول اسی بافر (Assay buffer) را به داخل هر چاهک بریزید و برای 15 ثانیه پلیت را تکان دهید تا محتویات چاهکها خوب مخلوط شوند و آنگاه درب چاهکها را با بر چسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت 30 دقیقه در درجه حرارت اتاق (22-28 درجه) انکوبه نمائید.
- 3- در ادامه بدون اینکه چاهکها را شستشو دهید 50 میکرو لیتر محلول (Enzyme Conjugate) آنزیم کونزوگه به هر چاهک اضافه نمائید و برای 15 ثانیه پلیت را تکان دهید تا محتویات چاهکها خوب مخلوط شوند و آنگاه درب چاهکها را با بر چسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت 30 دقیقه در درجه حرارت اتاق (22-28 درجه) انکوبه نمائید.
- 4- محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را 5 بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشوئید (برای شستشو می توان از سمپلر 8 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 300 میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی محلول شستشو خارج شوند.
- 5- 100 میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen – Substrate) به هر چاهک اضافه نمائید و چاهکها را به مدت 15 دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمائید .
- 6- با اضافه کردن 100 میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمائید . برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزا ریدر با فیلتر 450 nm استفاده نمائید . (توصیه می شود از فیلتر 630 nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد).

شرایط نگهداری فرآورده تشخیصی:

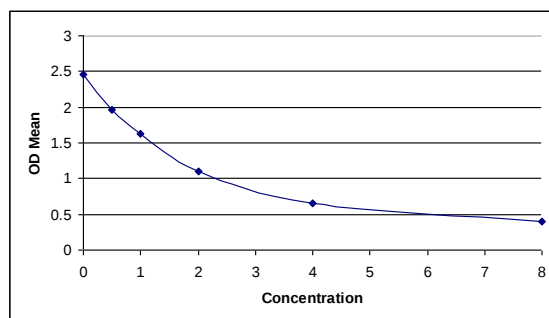
- 1- دمایی نگهداری کیت بین 2-8 C° می باشد و بهتر است که در 4C° نگهداری شود .
- 2- با توجه به انجام تست های Full Term , accelerate این کیت در صورت رعایت موارد نگهداری صحیح تا 12 ماه پایدار می باشد و در این مدت کیت حاضر بالای 90 درصد کارایی اولیه را داراست. با توجه به آزمایشات انجام شده در صورت باز نمودن کیت یک ماه پایدار می باشد .
- 3- چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمائید .
- 4- **توجه :** در صورت باز شدن درب کیت و محلول ها تازمانی که آلودگی میکروبی و قارچی رخ ندهد کیت پایدار خواهند بود.

محاسبه نتایج :

- 1- جذب نوری استاندارد ها و نمونه ها را به کمک دستگاه Eliza Reader در طول موج 450nm و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس 630nm بخوانید.
- 2- با استفاده از میانگین جذب نوری استاندارد ها 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 ، در ادامه نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمائید تا منحنی بدست آید.
- 3- 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 نمائید بطوریکه این خط کاملاً بر محور عمودی عمود باشد و در ادامه 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.

راهنمای کیت T3

	جذب نوری	استانداردها (ng/ml)
St 1	2.45	0
St 2	1.97	0.5
St 3	1.62	1.0
St 4	1.1	2.0
St 5	0.66	4.0
St 6	0.4	8.0



توجه: جذب های نوری و منحنی مربوط فقط به عنوان نمونه می باشند و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

شاخصهای اجرایی:

1- 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 0.1 ng/ml می باشد.

2- 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

آزمایشهای مختلف) با استفاده از 4 استاندارد با غلظتهای مختلف T3 انجام گردید که در جداول 1 و 2 آمده است.

جدول شماره 1 (اینترا-اسی)

نمونه	تعداد دفعات تکرار	میانگین ng/ml	SD ng/ml	CV%
1	12	0	0.167	8.1
2	12	1.0	0.125	8.3
3	12	2.0	0.24	6.8
4	12	4.0	0.8	9.0

جدول شماره 2 (اینترا-اسی)

نمونه	تعداد دفعات تکرار	میانگین ng/ml	SD ng/ml	CV%
1	5	0	0.155	7.7
2	5	1.0	0.112	6.5
3	5	2.0	0.90	5.1
4	5	4.0	0.27	8.6

هر سری آزمایش بصورت Duplicate انجام شده است.

3- ریکواری آزمایش: مقادیر معلومی از T3 به 4 سرم با غلظتهای مشخص T3 افزوده شد و ریکواری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول صفحه بعد آمده است.

جدول ریکواری:

نمونه	مقدار T3 موجود در سرم (ng/ml)	مقدار افزوده شده T3 (ng/ml)	مقدار مورد انتظار (ng/ml)	مقدار بدست آمده (ng/ml)	ریکواری (%)
1	0.5	1	0.75	0.7	93
1	0.5	4	2.25	2.1	93
1	0.5	8	4.25	4.1	96
2	1.4	1	1.1	1.1	100
2	1.4	4	2.7	2.5	92
2	1.4	8	4.7	4.5	95
3	2.5	1	1.75	1.8	102
3	2.5	4	3.25	3	92
3	2.5	8	5.25	4.75	90
4	3.6	1	2.3	2.15	93
4	3.6	4	3.8	3.6	94
4	3.6	8	5.8	5.2	89

4- خطی بودن آزمایش :

به کمک استاندارد صفر رقت‌های متوالی 4 نمونه استاندارد با غلظت مشخص از T3 تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت محاسبه شد که در جدول زیر نتایج آن آورده شده است .

جدول خطی بودن :

ریکوری (%)				مقدار T3 موجود در سرم رقیق نشده (ng/ml)	نمونه
%100	رقت %75	رقت %50	رقت %25		
93	101	92	94	2.0	1
96	97	98	90	4.0	2
92	95	93	99	8.0	3

5- اختصاصیت آزمایش :

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

جدول اختصاصیت (واکنش متقاطع) :

غلظت ظاهری T3 (ng/ml)	غلظت (µg/ml)	آنالیت
<0.1	10	Iodothyrosine
<0.1	10	Diiodothyrosine
<0.1	10	Diiodothyronine
<0.1	10	L-Thyroxine
<0.1	10	Phenylbutazone

References

1. Barjer, S.B., 1948. Determination of protein bound iodine. J. Biol. Chem. 173,175.
2. Chopra, I.j., Solomon, D.H. and Ho, R.S., 1971. A radioimmunoassay of triiodothyronine. J. Clin. Endocrinol. 33,865.
3. Young D.S., Prstaner, L.C. and Gilberman, U. 1975. Effects of drugs on clinical laboratory tests. Clin. Chem. 21, 3660.
4. Sterling, L. 1975. Diagnosis and treatment of thyroid disease, Cleveland CRC Press, 19-51.

Adress :

No:1161 , Bid Avenue , Payetakht , Industrial zone , Tehran , Iran

Tel : +98 21 66 56 91 84 - 66 59 37 41 Fax : +98 21 66 56 14 28

Email : info@biokarpira.com

www.biokarpira.com



043 ISO 9001-2008 13485