خلاصه روش کار

کاربرد

اندازه‌گیری غلظت T3 در سرم یا پلاسمای انسانی به‌روش ایمونوآنزیماتیک
(Cat.No. DG.T3.01) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

مقدمه

ساختار و نقش فیزیولوژیک: هورمون تری یدو تیرونین یا T3 که نقش حیاتی در حفظ عملکرد طبیعی تیروئید دارد، تقریبا ٪۵ از هورمون های تیروئیدی سرم را تشکیل می دهد. مولکول پیش ساز این هورمون، گلیکوپروتئین بزرگی به نام تیروگلوبولین است که حاوی ۷۰ اسید آمینه تیروزین می باشد. این اسید آمینه با جذب یک و دو مولکول ید به ترتیب به مونو یدوتیروزین و دی یدوتیروزین تبدیل می گردد. سپس با ترکیب این دو مولکول، تری یدو تیرونین تولید می شود. [۱،۲] فقط ۲۰ درصد این هورمون مستقیما از غده تیروئید ترشح می گردد مابقی در اثر deiodination تیروکسین در کبد ایجاد می شود. زمانیکه هورمونهای تیروئیدی بوسیله پروتئینهای حامل به ارگان مقصد خود می رسند T4 به عنوان pro-hormone عمل می کند و توسط آنزیمی به نام deiodinase یکی از چهار ید آن برداشته می شود. اگر از حلقه بیرونی T4 یک ید برداشته شود T3 و اگراز حلقه داخلی ید برداشته شود reverse T3 تولید می شود که تقریبا غیر فعال است و نقش هورمونی مهمی ندارد.[۲] نیمه عمر این هورمون در بدن ۷ روز بوده و تولید آن به صورت مکانیسم فیدبک منفی تحت تاثیرهورمون تیروتروپین یا TSH (Thyroid stimulating hormone) کنترل می شود. بدین ترتیب که هورمون آزاد کننده تیروتروپین یا TRH (Thyrotropin releasing hormone) مترشحه از هیپوتالاموس، منجر به تحریک سنتز TSH از غده هیپوفیز شده، سپس TSH آزاد شده با اتصال به گیرنده های اختصاصی غشاء سلولهای تیروئید موجب ترشح هورمون T3 به خون می گردد. [۱،۳] فرم فعال این هورمون به صورت T3 آزاد می باشد که کمتر از ۰/۰۵ درصد از کل T3 سرم را شامل می شود. بیش از ۹۹/۹۵ درصد T3 سرم به پروتئینهای متصل شونده به T4یا TBP (Thyroxine binding protein) متصل است از جمله پروتئین TBG (Thyroid binding globulin) که ظرفیت بالایی برای پیوند با T3 دارد، Transthyretin و آلبومین را می توان نام برد. [۳] این پروتئینها برقرار کننده تعادل سرم بوده و به محض جذب تیروکسین به سلولهای هدف، هورمون T3 مورد نیاز را آزاد می کنند. [۴]
مهمترین عملکرد هورمونهای تیروئیدی تنظیم متابولیسم پایه بدن است به طوریکه افزایش یا کاهش آنها تاثیر مستقیم بر متابولیسم کربوهیدراتها، لیپیدها و پروتئینها دارد. علاوه بر آن این هورمونها از ابتدای دوره جنینی در تمایز و رشد سلولی تاثیر بسزایی دارند. بطور کلی تقریباً تمام سلولهای بدن تحت تاثیر هورمونهای تیروئیدی هستند. [۵،۶]

کاربرد بالینی: تعیین غلظت T3 در کنار دیگر هورمونهای مترشحه از غده تیروئید و یا اثر گذار بر آن، در تشخیص افتراقی بیماریهای تیروئیدی و تعیین انواع نارسایی های غدد تیروئید، هیپوفیز و هیپوتالاموس حائز اهمیت می باشد. [۱] در غالب روشهای اندازه گیری T3 ، غلظت این هورمون در نمونه های حاوی TBP بالا (به طور مثال در دوران حاملگی، هیپرپروتئینمی، بیماریهای وراثتی با میزان TBG بالا، در اثر مصرف استروژن یا داروهای ضد بارداری) بالاتر از حد نرمال می باشد. بالعکس در اکثر نمونه های حاوی TBP پایین تر از حد طبیعی (همچون هیپوپروتئینمی، آکرومگالی و برخی بیماریهای کلیوی و گوارشی) غلظت هورمون T3 از حد میانگین پایین تر است. [۶] در این موارد تفسیر نتایج بدست آمده و تشخیص افتراقی بیماریهای مرتبط با اندازه گیری غلظت T3 کل جهت ارزیابی عملکرد تیروئید به تنهایی کفایت نمی کند. [۷]
عمده بیماریهایی که باعث افزایش T3 سرمی می شوند عبارتند از پر کاری تیروئید، بیماریهای گریوز، آدنوم تیروئید سمی، گواتر مولتی ندولار سمی، تیروئیدیت گرانولوما یا نیمه حاد، سندرم مقاومت به هورمون تیروئید و ماکرو آدنوما.
میزان هورمون T3 درموارد کم کاری تیروئیدی ثانویه یا مرکزی، تیروئیدیت هاشیموتو، برداشتن غده تیروئید و رادیوتراپی کاهش می یابد. [۶]
در تشخیص Thyrotoxicosis که غلظت T3 سرم بالاست و میزان T4 نرمال می باشد، سنجش میزان T3 نقش تعیین کننده دارد. [۸]

اساس روش سنجش

مدت زمان انجام تست: ۶۰ دقیقه + ۲۰ دقیقه

طراحی کیت T3 بر اساس روش ایمونوآنزیماتیک رقابتی می باشد. در این روش T3 موجود در نمونه ها برای اتصال به آنتی بادی مونوکلنال ضدT3 ، پوشش داده شده بر روی چاهکها، با T3 متصل به آنزیم پراکسیداز (T3-HRP) رقابت می کند. لذا رابطه معکوسی بین میزان T3-HRP متصل به آنتی بادی مونوکلنال ضد T3 با غلظت T3 موجود در نمونه وجود دارد. پس از شستشو و خارج کردن آنالیتهای غیر متصل با افزودن سوبسترا، تترا متیل بنزیدین(TMB)، آنزیم رنگ آبی ایجاد می کند. با اضافه نمودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می شود. شدت رنگ ایجاد شده که با غلظت T3نمونه ارتباط معکوس دارد، در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) اندازه گیری می گردد.

توجه و احتیاط

- این کیت تشخیصی به صورت *in vitro* قابل استفاده می‌باشد.
- اجزای اختصاصی این کیت برای مصرف با اجزای هم سری ساخت کیت ارائه شده‌اند.
- اجزای عمومی کیت شامل محلول‌های شستشو، رنگ زا و متوقف‌کننده می‌باشند که برای سایر محصولات دیازیست نیز قابل استفاده هستند.
- جهت کاهش پدیده تأخیری، ضرورت دارد زمان انجام مرحله اول تست در کمتر از ۱۰ دقیقه انجام شود.
- توصیه می‌شود در هر تست استانداردها جهت رسم منحنی استفاده شوند، همچنین درصورتی که همزمان بیش از یک پلیت تست گذاشته شود، رسم منحنی برای هر پلیت ضروری است.
- کالیبره بودن ابزارها و دستگاه‌ها در صحت نتایج اثر گذار است.
- جهت ساخت اجزای این کیت از مواد شیمیایی و زیستی استفاده شده است. لذا توصیه می‌شود هنگام کار از تماس مستقیم با مواد پرهیز شود.

محتویات کیت

اجزای تشکیل دهنده کیت ۹۶ و ۱۹۲ تستی T3 به شرح زیر می باشد:

ردیف	نام اجزاء	مقدار/تعداد	بسته‌بندی
۱	پلیت پوشانده شده با آنتی‌بادی مونوکلنال ضد T3 (Anti- T3 Antibody Coated Microtiter Plate)	1/96 wells	۹۶تستی
		2/96 wells	۱۹۲تستی
۲	استانداردهای A-F (Standards A-F) برحسب (ng/ml) (ng/ml × 1.536= nmol/L)	6 /1ml	۹۶تستی
		6 /1ml	۱۹۲تستی
۳	کنترل پایین و بالا (Controls Low & High)	2 /1ml	۹۶تستی
		2 /1ml	۱۹۲تستی
۴	محلول شستشوی غلیظ (Concentrated Wash Buffer)	1/25 ml	۹۶تستی
		1/25 ml	۱۹۲تستی
۵	محلول رقیق کننده آنزیم کونژوگه (Tracer Diluent)	1/12 ml	۹۶تستی
		1/24 ml	۱۹۲تستی
۶	محلول غلیظ آنزیم (HRP)کونژوگه شده به T3 (T3 -HRP Conjugate)	1/1.2 ml	۹۶تستی
		1/2.5 ml	۱۹۲تستی
۷	محلول رنگ زا (TMB Substrate)	1/12 ml	۹۶تستی
		1/25 ml	۱۹۲تستی
۸	محلول متوقف‌کننده (Stop Solution)	1/12 ml	۹۶تستی
		1/25 ml	۱۹۲تستی

شرایط نگهداری و پایداری

- کیت را در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد نگهداری کنید.
- پایداری کیت در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد، قبل از شروع استفاده (In Shelf) و حین استفاده(In use) بر مبنای استاندارد CLSI (EP25 -A)[۹] بررسی گردید که نتایج به شرح زیر می‌باشد:

قبل از شروع استفاده (In Shelf)	تا پایان تاریخ انقضا
حین استفاده (In use)	تا ۶ ماه

جمع آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه مورد نیاز جهت اندازه‌گیری T3، سرم یا پلاسمای به‌دست آمده با مواد ضد انعقاد هپارین، سیترات سدیم و EDTA می‌باشد. جهت پایداری نمونه‌ها از سدیم ازاید(Sodium Azide) استفاده نشود. نمونه ها در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد تا ۷ روز و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا یک ماه قابل نگهداری هستند. [۱۰] از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه‌ها پرهیز نمایید. جهت اندازه گیری T3 نمونه‌های منجمد شده، ابتدا نمونه را در دمای اتاق ذوب و بعد با حرکت دست یکنواخت‌نمایید.

مواد و وسایل لازم که همراه کیت عرضه نمی شوند

- دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ و۶۳۰ نانومتر کالیبر شده
- سمپلرهای ۱۰۰ و ۲۵ میکرولیتر کالیبر شده
- سرسمپلرهای یک‌بار مصرف
- آب مقطر برای رقیق سازی محلول شستشوی غلیظ

روش انجام تست

قبل از انجام تست:

- تمام مواد و نمونه ها را به دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد) برسانید.
- برای تهیه محلول کونژوگه مصرفی، **یک** حجم محلول کونژوگه غلیظ را با **۱۰** حجم محلول رقیق کننده کونژوگه مخلوط نمایید.
- برای تهیه محلول شستشوی قابل مصرف، **یک** حجم محلول شستشوی غلیظ (20x) را با **۱۹** حجم آب مقطر رقیق نمایید.

مراحل انجام تست :

۱. ۲۵ میکرولیتر از هر استاندارد، کنترل و نمونه سرم به چاهک مربوطه بریزید. سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول آنزیم کونژوگه اضافه نموده و پلیت را روی میز ۱۵ ثانیه تکان دهید تا به خوبی مخلوط شوند.

۲. روی چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پوشانده و مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.

۳. چاهک‌ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.

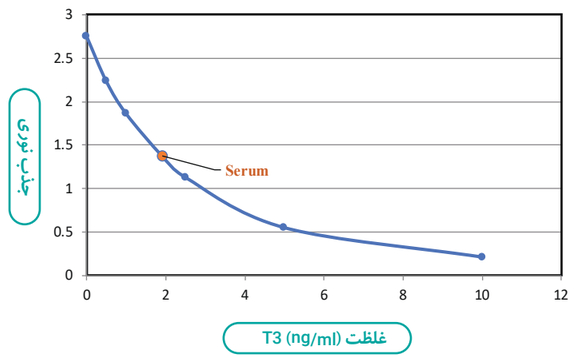
۴. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگ زا اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.

۵. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده اضافه نمایید و بعد از مخلوط کردن به مدت ۱۵ ثانیه، میزان جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر، حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، بخوانید.

محاسبه نتایج

غلظت T3 نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد (رسم به‌صورت دستی یا دستگاه الایزا ریدر) تعیین می‌گردد. در این منحنی جذب نوری استانداردها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر بر روی محور عمودی (Y) و غلظت آن‌ها را بر حسب ng/ml بر روی محور افقی (X) مشخص کنید و بر اساس آن منحنی را رسم نمایید. با استفاده از منحنی ترسیم شده و جذب نوری بدست آمده از نمونه، غلظت T3 آن قابل محاسبه می‌باشد. جدول و نمودار زیر به عنوان مثال ارائه شده است.

غلظت T3(ng/ml)	میانگین جذب نوری	جذب نوری	نمونه
۰	۲/۷۵۸	۲/۷۰۱	استاندارد A
		۲/۸۱۵	
۰/۵	۲/۲۳۷	۲/۲۰۹	استاندارد B
		۲/۲۶۵	
۱	۱/۸۶۴	۱/۸۴۳	استاندارد C
		۱/۸۸۵	
۲/۵	۱/۱۳۵	۱/۱۶۱	استاندارد D
		۱/۱۰۹	
۵	۰/۵۵۱	۰/۵۰۴	استاندارد E
		۰/۵۹۸	
۱۰	۰/۲۱۲	۰/۱۹۹	استاندارد F
		۰/۲۲۵	
۰/۶۱	-	۲/۱۳۲	کنترل پایین
۲/۴۱	-	۱/۱۷۰	کنترل بالا
۱/۹۴	-	۱/۳۸۰	سرم



کنترل کیفی

تست در صورتی تأیید می‌گردد که:

- جذب نوری استاندارد صفر بیش از ۱/۴ باشد.
- خوانش کنترل‌های پایین و بالای کیت در محدوده مورد قبول باشد.
- توصیه می‌گردد جهت حصول اطمینان از نتایج کیت، علاوه بر کنترل‌های ارائه شده در کیت، به صورت دوره‌ای از کنترل‌های دقت و صحت تجاری نیز استفاده گردد. بدیهی است نتایج بدست آمده بایستی در محدوده مورد قبول قرائت گردد.

تداخل‌ها و محدودیت‌ها

- جهت بررسی اختصاصیت آنتی بادی به کار رفته در این کیت، اثر تداخلی آنالیتهای هورمونی قید شده در جدول زیر بررسی گردید. درصد تداخل نسبت غلظت T3 به ماده افزوده شده است که جایگزین ۵۰٪ واکنشهای T3-HRP با آنتی بادی ضد T3 گردیده است. بنا به نتایج مندرج در جدول زیر اثر تداخلی آنالیت های افزوده شده قابل توجه نمی باشد.

ماده افزوده شده	درصد تداخل(Cross-reactivity)
d-Thyroxine	۰/۲
L-Thyroxine	۰/۳
Iodothyrosine	<۰/۱
Diiodothyrosine	<۰/۱
Diiodothyronine	<۰/۱

- اثر تداخلی بیلی روبین (تا ۲۰ mg/dl)، هموگلوبین (تا ۵۰۰ mg/dl)، تری گلیسیرید (تا ۲۰۰۰ mg/dl) و فاکتورهای روماتوئید(تا ۱۲۰۰ IU/ml) در سرم کمتر از ۵٪ می باشد.
- نمونه سرم یا پلاسمای افرادی که سابقه درمان یا تشخیص بیماری با مواد حاوی آنتی‌بادی مونوکلنال موش داشته‌اند، می‌تواند حاوی آنتی بادی‌های انسانی ضد موش (HAMA) باشد. با توجه به غلظت آنتی‌بادی و مواد بازدارنده مورد استفاده در این کیت، واکنش‌های تداخلی غیر اختصاصی به حداقل رسیده و تا کنون واکنش مثبت کاذب مشاهده نشده است.
- محدوده قابل اندازه‌گیری غلظت T3 با این کیت، ۱۰ ng/ml -۰/۱ می‌باشد.

مقادیر طبیعی

دامنه مقادیر طبیعی با اندازه گیری غلظت سرمی T3، ۲۹۰ فرد بالغ سالم (euthyroid) تعیین گردید. بنا به نتایج بدست آمده غلظت سرمی T3 این افراد در محدوده ۲/۰-۰/۷ ng/ml با میانگین ۱/۲۵ ng/ml است.

توصیه می گردد هر آزمایشگاه با اندازه گیری غلظت T3 افراد سالم، مقادیر طبیعی مرجع خود را تعیین و از آن برای تفسیر نتایج استفاده نماید.

ویژگی‌های اختصاصی کیت

۱. حساسیت: حداقل غلظت قابل اندازه گیری T3 که از نمونه فاقد آنالیت قابل تمایز باشد را حساسیت گویند. این مقدار که بر اساس میانگین غلظت استاندارد صفر بعلاوه دو برابر انحراف معیار محاسبه گردیده است (**بدست آمده از ۱۰ تست**)، ۰/۱ ng/ml می‌باشد.

۲. صحت: غلظت T3، ۲۹۹ نمونه تصادفی با کیت دیازیست و روش مرجع (ELFA) اندازه‌گیری شد. نتایج بدست‌آمده از مقایسه دو روش ضریب همبستگی خطی (r) ۰/۹۸ را نشان می‌دهد. غلظت نمونه‌ها با کیت دیازیست بین ۰/۱ ng/ml تا ۷/۹۳ و با روش مرجع ۰/۱۲ ng/ml تا ۷/۵۴ بود. نتایج مقایسه دو روش به شرح زیر است:

روش	تعداد نمونه	غلظت نمونه‌ها (ng/ml)	Intercept	Slope
Passing/Bablok	۲۹۹	۰/۱-۸	۰/۰	۱/۰
Linear Regression	۲۹۹	۰/۱-۸	۰/۰۲	۰/۹۹

DiaZist
کیت سنجش T3

۳. دقت: شاخص دقت این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP5-A2) [11] ارزیابی گردیده است. بدین منظور میزان T3، ۳ نمونه سرمی با غلظت‌های مختلف اندازه‌گیری و انحراف معیار و ضریب تغییرات محاسبه گردید که در جدول زیر آمده است.:

شماره نمونه	تعداد سنجش	میانگین غلظت (ng/ml)	Within Run		Total	
			SD	٪CV	SD	٪CV
۱	۶۰	۰/۸۰	۰/۰۲	۲/۵۹	۰/۰۳	۴/۲۷
۲	۶۰	۲/۳۴	۰/۰۸	۳/۵۷	۰/۱۰	۴/۴۲
۳	۶۰	۴/۱۲	۰/۱۳	۳/۲۲	۰/۲۳	۵/۶۸

۴. خطی بودن: به منظور بررسی صحت اندازه‌گیری نمونه‌های با غلظت بالای ULoQ (upper limit of quantitation) تست خطی بودن این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP34) [12] انجام گردید. بدین منظور نمونه سرم با غلظت ۷/۱۱ ng/ml با پلاسمای انسانی فاقد T3 (Depleted Plasma) به صورت متوالی رقیق شد. سپس غلظت‌ها با کیت T3 اندازه گیری گردید. درصد ریکاوری رقت که شاخص میزان دقت رقت‌گیری می باشد، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\frac{\text{غلظت اندازه‌گیری شده (ng/ml)}}{\text{غلظت مورد انتظار (ng/ml)}} \times ۱۰۰$$

(محدوده درصد ریکاوری بدست آمده بین ۹۶/۶ تا ۱۰۴/۴ است)

٪ ریکاوری	غلظت اندازه گیری شده (ng/ml)	غلظت مورد انتظار (ng/ml)	رقت
۱۰۲/۵	۳/۶۴	۳/۵۵	۱:۲
۹۶/۶	۱/۷۲	۱/۷۸	۱:۴
۱۰۴/۴	۰/۹۳	۰/۸۹	۱:۸
۱۰۰/۰	۰/۴۴	۰/۴۴	۱:۱۶

۵. بازیابی: به‌منظور بررسی اثر ماتریکس، تست بازیابی این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP34) [12] انجام گردید. بدین منظور مقادیر متفاوتی از نمونه حاوی T3 با غلظت بالا (۶/۸۱ng/ml) به نمونه مورد بررسی حاوی T3 با غلظت پایین (۰/۲۵ng/ml) افزوده شد. سپس غلظت نمونه‌ها با کیت T3 اندازه‌گیری گردید و درصد ریکاوری که شاخص میزان دقت بازیابی می‌باشد، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\frac{a-b}{c} \times 100$$

a: غلظت اندازه‌گیری‌شده نمونه مورد بررسی بعد از افزودن آنالیت

b: غلظت اندازه‌گیری‌شده نمونه مورد بررسی بعد از افزودن محلول رقیق‌کننده

C: غلظت آنالیت افزوده شده

(درصد ریکاوری بدست آمده بین ۹۶/۹ تا ۱۰۵/۳ است)

٪ ریکاوری	c (ng/ml)	b (ng/ml)	a (ng/ml)
۹۶/۹	۰/۳۲	۰/۲۹	۰/۶۰
۹۸/۴	۰/۶۲	۰/۲۸	۰/۸۹
۱۰۵/۳	۱/۱۳	۰/۲۵	۱/۴۴
۱۰۲/۶	۱/۹۵	۰/۲۲	۲/۲۲

منابع

1. Visser T.J. Oxford Textbook of Endocrinology and Diabetes. Chapter:Biosynthesis, transport, metabolism, and actions of thyroid hormones, Second edition, 2011.
2. DeRuiter J. Thyroid hormone tutorial: the thyroid and thyroid hormones. Endocrine Pharmacotherapy Module: Thyroid Section, Summer, 2001.
3. Kim HY., Mohan S. Role and Mechanisms of Actions of Thyroid Hormone on the Skeletal Development. Bone Research.2: 146-61, 2013.
4. Woeber KA, Ingbar SH. The Contribution of Thyroxine-Binding Prealbumin to the Binding of Thyroxine in Human Serum, as Assessed by Immunoadsorption. J Clin Invest. 47:1710-1721,1968.
5. Mondal S, et al. Chemistry and Biology in the Biosynthesis and Action of Thyroid Hormones. Angew Cheme In Engl. 55(27):7606-30, 2016.
6. Epocrates. Thyroid function testing, 2018.
7. Szpunar WE, et al. Clinical Evaluation of a Thyroxine-Binding Globulin Assay in Calculating a Free-Thyroxine Index. J Nucl Med. 22:793-795, 1981.
8. Sterling K, Refetoff S, Selenkow HA. T3 Thyrotoxicosis: Thyrotoxicosis Due to Elevated Serum Triiodothyronine Levels. JAMA 213:571-575, 1970.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Stability of *In Vitro* Diagnostic Reagents; Approved Guideline – First Edition. NCCLS Document EP25-A. 2009.
10. Wu AHB. Tietz Clinical Guide To Laboratory Tests. Saunders Elsevier, Philadelphia, 4th edition, section II, p. 1076-1077, 2006.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline – Second Edition. NCCLS Document EP5-A2. 2004.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Establishing and Verifying an Extended Measuring Interval Through Specimen Dilution and Spiking – First Edition. EP34. 2018.

تهران،خیابان سهروردی شمالی،خیابان افشار جوان،پلاک ۲، واحد ۱۰
تلفن ویژه: ۷۲۴۵۷-۰۲۱
office@garnimed.com
www.garnimed.com

Published: Dec. 2018