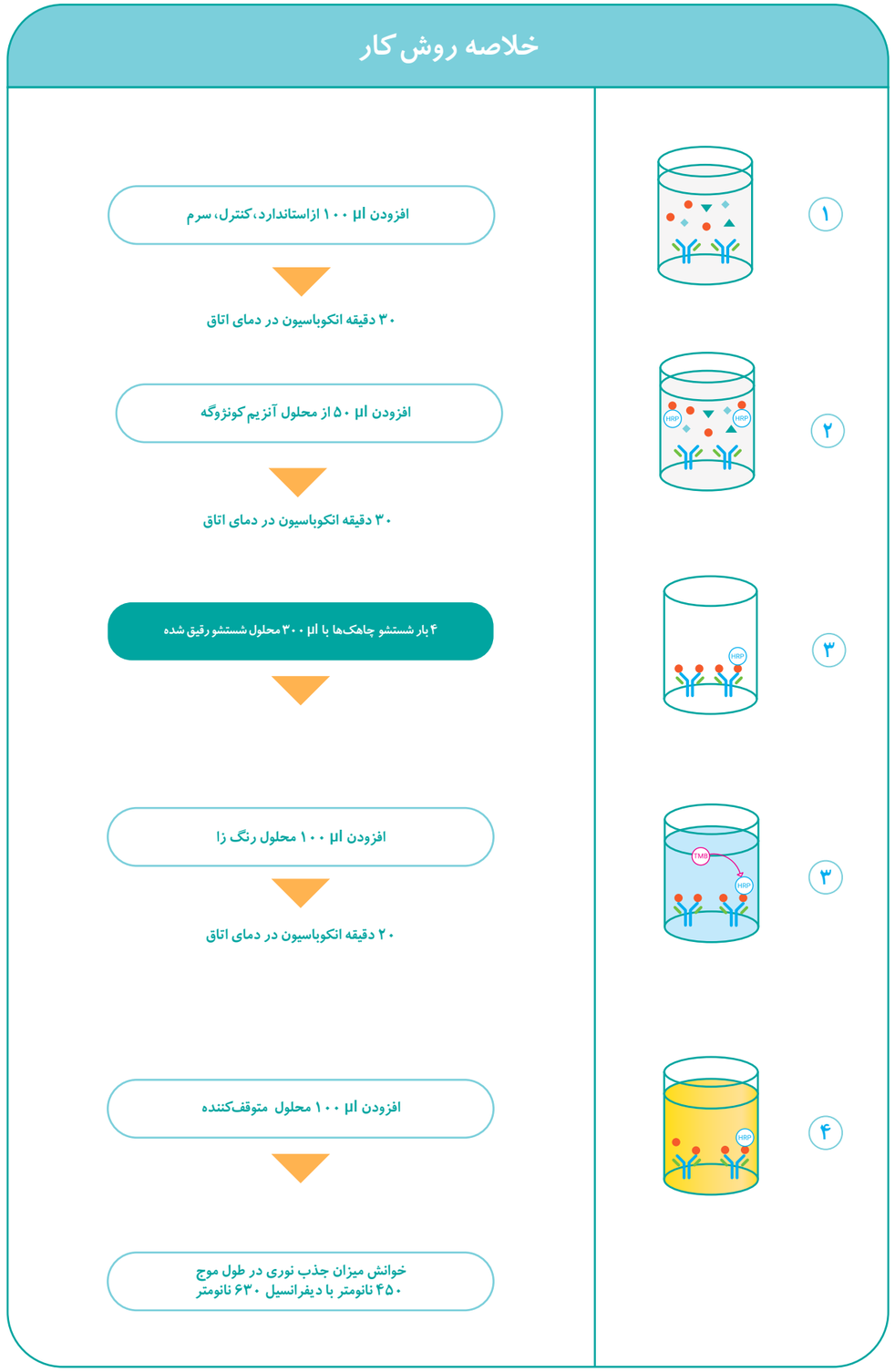
خلاصه روش کار



کاربرد

اندازه‌گیری غلظت Free T3 در سرم یا پلاسمای انسانی به‌روش ایمونوآنزیماتیک
(Cat.No. DG.FT3.01) 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 از۰/۰۵ 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] بر خلاف غالب روشهای اندازه گیری T3، تعیین غلظت T3 آزاد تحت تاثیر میزان TBP و ویژگیهای اتصالی آن نبوده و اندازه گیری این هورمون شاخص مناسب تری جهت بررسی نارسائی های مربوطه 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) و نیز نمونه های حاوی TBP پایین تر از حد طبیعی(همچون هیپوپروتئینمی، آکرومگالی وبرخی بیماریهای کلیوی و گوارشی)می باشد.[۶،۷]

عمده بیماریهایی که باعث افزایش T3 آزاد 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 آزاد درموارد کم کاری تیروئیدی ثانویه یا مرکزی، تیروئیدیت هاشیموتو، برداشتن غده تیروئید و رادیوتراپی کاهش می یابد. [۶]

بر خلاف بیماری گواتر چند گرهی سمی و درمان با مشتقات تیروکسین که میزان Free T4 از میزان Free T3 بالاتر است، در مواردی از پرکاریهای تیروئیدی (۵ درصد)، مانند" T3 Thyrotoxicosis" تنها غلظت Free T3 افزایش می یابد. در نتیجه اندازه گیری نوع آزاد این هورمون در تشخیص افتراقی این نارسایی مفید می باشد. [۸]

اساس روش سنجش

مدت زمان انجام تست: ۳۰ دقیقه + ۳۰ دقیقه + ۲۰ دقیقه

طراحی کیت Free T3 بر اساس روش ایمونوآنزیماتیک رقابتی می باشد. در این روش Free T3 موجود در نمونه ها برای اتصال به آنتی بادی مونوکلنال ضد T3 ، 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 Free 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 T3 نمونه 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.
- کلیه محلول‌های کیت آماده مصرف هستند، فقط محلول شستشوی غلیظ (20x) قبل از استفاده نیاز به رقیق‌سازی دارد.
- 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 تستی Free T3 به شرح زیر می باشد:

ردیف	نام اجزاء	مقدار/تعداد
۱	پلیت پوشانده شده با آنتی‌بادی مونوکلنال ضد T3 (Anti- T3 Antibody Coated Microtiter Plate)	1/96 wells
۲	استانداردهای A-F (Standards A-F) برحسب (pg/ml) (pg/ml × 1.536= pmol/L)	6/1.5 ml
۳	کنترل پایین و بالا (Controls Low & High)	2/1.5 ml
۴	محلول شستشوی غلیظ (Concentrated Wash Buffer)	1/12 ml
۵	محلول آنزیم (HRP)کونژوگه شده به T3 (T3 -HRP Conjugate)	1/6 ml
۶	محلول رنگ زا (TMB Substrate)	1/12 ml
۷	محلول متوقف کننده (Stop Solution)	1/12 ml

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 Free 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 اندازه‌گیری Free T3 نمونه‌های منجمد شده، ابتدا نمونه را در دمای اتاق ذوب و بعد با حرکت دست یکنواخت نمایید.

مواد و وسایل لازم که همراه کیت عرضه نمی شوند

- دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ و۶۳۰ نانومتر کالیبر شده
- سمپلرهای ۱۰۰ و ۵۰ 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 شستشوی قابل مصرف، **یک** حجم محلول شستشوی غلیظ(20x) را با **۱۹** حجم آب مقطر رقیق نمایید.

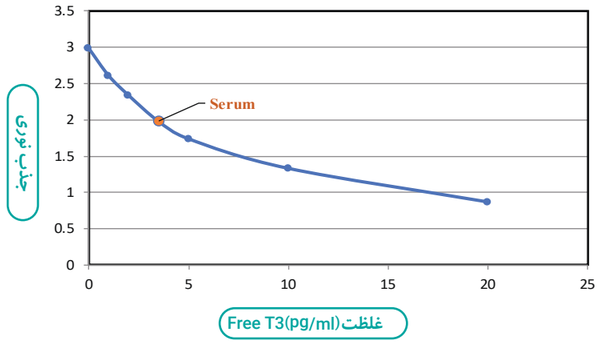
مراحل انجام تست :

۱. ۱۰۰ میکرولیتر از هر استاندارد، کنترل و نمونه سرم به چاهک مربوطه بریزید.
۲. روی چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پوشانده و مدت **۳۰** دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۳. سپس به هر چاهک **۵۰** میکرولیتر محلول آنزیم کونژوگه اضافه نمایید. پلیت را روی میز به خوبی تکان دهید تا مخلوط شوند.
۴. روی چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پوشانده و مدت **۳۰** دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۵. چاهک‌ها را **۴** بار با **۳۰۰** میکرولیتر محلول شستشو بشویید.
۶. به هر چاهک **۱۰۰** میکرولیتر محلول رنگ زا اضافه نمایید و پلیت را به مدت **۲۰** دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۷. 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 Free T3 نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد (رسم به‌صورت دستی یا دستگاه الایزا ریدر) تعیین می گردد. در این منحنی جذب نوری استانداردها را در طول موج **۴۵۰** نانومتر بر روی محور عمودی (Y) و غلظت آن‌ها را بر حسب pg/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 Free T3 آن قابل محاسبه می‌باشد. جدول و نمودار زیر به عنوان مثال ارائه شده است.

غلظت Free T3 (pg/ml)	میانگین جذب نوری	جذب نوری	نمونه
۰	۲/۹۹۱	۲/۸۷۹	استاندارد A
		۳/۱۰۳	
۱	۲/۶۱۲	۲/۵۰۱	استاندارد B
		۲/۷۲۳	
۲	۲/۳۴۲	۲/۳۰۵	استاندارد C
		۲/۳۷۹	
۵	۱/۷۴۰	۱/۶۸۲	استاندارد D
		۱/۷۹۸	
۱۰	۱/۳۳۳	۱/۲۳۸	استاندارد E
		۱/۴۲۸	
۲۰	۰/۸۷۰	۰/۸۵۴	استاندارد F
		۰/۸۸۶	
۰/۹۵	-	۲/۶۳۳	کنترل پایین
۹/۶۰	-	۱/۳۴۳	کنترل بالا
۳/۶۰	-	۱/۹۸۸	سرم



کنترل کیفی

تست در صورتی تأیید می گردد که:

- جذب نوری استاندارد صفر بیش از **۱/۴** باشد.
- خوانش کنترل‌های پایین و بالای کیت در محدوده مورد قبول باشد.
- توصیه می گردد 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 Free 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 Free T3 با این کیت، **۲۰ pg/ml - ۰/۱** می‌باشد.

مقادیر طبیعی

دامنه مقادیر طبیعی با اندازه گیری غلظت سرمی Free T3، ۲۶۰ فرد بالغ سالم (euthyroid) تعیین گردید. بنا به نتایج بدست آمده غلظت سرمی FT3 این افراد در محدوده ۴/۲-۱/۷ pg/ml با میانگین ۲/۸۵ pg/ml است.
توصیه می گردد هر آزمایشگاه با اندازه گیری غلظت Free 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 Free 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 pg/ml** می‌باشد.
۲. صحت: غلظت Free T3، **۲۴۵** نمونه تصادفی با کیت دیازیست و روش مرجع (ELFA) اندازه‌گیری شد. نتایج بدست‌آمده از مقایسه دو روش ضریب همبستگی خطی (r) **۰/۹۷** را نشان می‌دهد. غلظت نمونه‌ها با کیت دیازیست بین **۰/۳۱ pg/ml تا ۱۴/۳۶** و با روش مرجع **۰/۳۳ pg/ml** تا **۱۴/۰۶** بود. نتایج مقایسه دو روش به شرح زیر است:

روش	تعداد نمونه	غلظت نمونه‌ها (pg/ml)	Intercept	Slope
Passing/Bablok	۲۴۵	۰/۳-۱۵	۰/۰۴	۰/۹۹
Linear Regression	۲۴۵	۰/۳-۱۵	۰/۲۰	۰/۹۴

۳. دقت: شاخص دقت این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP5-A2) [11] ارزیابی گردیده است. بدین منظور میزان Free 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 (pg/ml)	Within Run		Total	
			SD	٪CV	SD	٪CV
۱	۶۰	۲/۰۰	۰/۰۷	۳/۶۳	۰/۰۸	۳/۹۱
۲	۶۰	۴/۹۹	۰/۱۴	۲/۷۱	۰/۱۴	۲/۷۴
۳	۶۰	۱۳/۹۶	۰/۶۸	۴/۸۶	۰/۶۶	۴/۷۴

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 **۱۴/۲۰ pg/ml** با پلاسمای انسانی فاقد T3 (Depleted Plasma) به صورت متوالی رقیق شد. سپس غلظت‌ها با کیت FreeT3 اندازه‌گیری گردید. درصد ریکاوری رقت که شاخص میزان دقت رقت‌گیری می باشد، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

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

(محدوده درصد ریکاوری بدست آمده بین ۹۶/۸ تا ۱۰۵/۶ است)

٪ ریکاوری	غلظت اندازه گیری شده (pg/ml)	غلظت مورد انتظار (pg/ml)	رقت
۹۶/۸	۶/۸۷	۷/۱۰	۱:۲
۹۹/۲	۳/۵۲	۳/۵۵	۱:۴
۱۰۱/۷	۱/۸۱	۱/۷۸	۱:۸
۱۰۵/۶	۰/۹۴	۰/۸۹	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 Free T3 با غلظت بالا (**۱۳/۸۰pg/ml**) به نمونه مورد بررسی حاوی Free T3 با غلظت پایین (**۱/۲۴pg/ml**) افزوده شد. سپس غلظت نمونه‌ها با کیت Free 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 ۹۶/۸ تا ۱۰۵/۱ است)

٪ ریکاوری	c (pg/ml)	b (pg/ml)	a (pg/ml)
۱۰۱/۵	۰/۶۶	۱/۲۷	۱/۹۴
۹۶/۸	۱/۲۵	۱/۳۳	۲/۵۴
۹۸/۷	۲/۳۰	۱/۳۱	۳/۵۸
۱۰۵/۱	۳/۹۴	۱/۳۱	۵/۴۵

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. Wahner HW. T3 Hyperthyroidism. Mayo Clin Proc. 47:938-43,1972.
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