راهنمای کیت

Free T3

مقدمه:

هورمون T3 از غده تیروئید ترشح شده و حدود 99.7 % آن در خون به وسیله پروتئینهای حامل که شامل TBG ، پره آلبومین (TBPA) و آلبومین می باشند، حمل می گردد و در حدود 0.3 درصد از T3 به صورت آزاد و غیر متصل به پروتئینها می باشد و در واقع همین شکل آزاد هورمون است که دارای فعالیت بیولوژیک است. هورمون T3 در سوخت و ساز سلولی و رشد و تمایز بدن موثر است، بنا براین مقدار T3 در خون یک مقدار مهم در تعیین وضعیت تیروئید و متابولیسم بدن می باشد، اما به علت تغییر غلظت پروتئینهای حامل در بسیاری از تغییرات کلینیکی مانند حاملگی و مصرف داروها - مصرف قرصهای ضد بارداری – استروژن درمانی – مصرف فنی توئین و آندروژنها، T3 کل دچار تغییرات کاذب می شود در حالیکه مقدار Free T3 ثابت است. بنابر این اندازه گیری Free T3 ارتباط قابل اعتمادتری با وضعیت کلینیکی بیمار در مقایسه با T3 کل نشان می دهد. به علاوه در بعضی از افراد مبتلا به هیپر تیروئیدیسم که مقدار TSH پایین و Free T4 در حد نرمال می باشد تعیین مقدار Free T3 درتشخیص کمک کننده می باشد.

کاربرد بالیني آزمایش:

در موارد هیپر تیروئیدیسم - T3 توکسیکوز – سندروم مقاوم محیطی، مقدار Free T3 بالا می رود و در موارد هیپو تیروئیدیسم (اولیه و ثانویه) و سه ماهه سوم بارداری مقدار Free T3 پایین می آید.

محدوده طبیعی:

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

محدوده طبیعي pg/ml	میانگین محدوده طبیعي pg/ml
1.9 -4.4	3.2

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 ونمونه بیماران با آنتی بادی Coat شده در چاهکها مجاور می شود و سپس محلول اسی بافر (assay buffer) و پس از انکوباسیون T3 متصل به HRP 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 مقدارT3 در نمونه بیشتر باشد مقدار T3 کنژوگه کمتری به آنتی بادی های کوت شده متصل می گردد وبالعکس. در ادامه پس از شستشو ، محلول رنگزا که حاوی H2O2 و کروموژن 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 آوري و آماده سازي نمونه :

نمونه سرم ارجح است ولي از پلاسماي هپارينه يا همراه با EDTA هم استفاده كرد و براي مدت طولاني تر دريخچال و 20- نگهداري شود(حد اكثر تا 30 روز). از فريز و ذوب كردن نمونه بايد اجتناب كرد.

واکنش تداخلی:

داروها و اسیدهای چرب آزاد تداخل ایجاد می کنند.

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 pg/ml صفر، 1، 2.5، 5، 10، 20 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 هائی 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 کنژوکه 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 الایزا (Eliza Reader) دارای فیلتر 450 نانومتر ودر صورت امکان 630 به عنوان فیلتر رفرانس.
2- سمپلر های 50 و 100 میکرولیتر دقیق
3- آب مقطر

نکات قابل ذکر براي مصرف كنندگان :

1- محتويات اين كيت براي مصرف در همين كيت مي باشد .
2- از مخلوط كردن محتويات كيتها باشماره ساختهاي مختلف جدا" خودداري نمائيد .

3- کليه مواد موجود در کيت که منشاء سرمي دارند از نظر وجود HIV,HCV, HBs AG کنترل گرديده اند و فاقد اين عوامل مي باشند . جهت احتياط بهتراست هر کاربري که با کيت کار مي کند از تماس مستقيم با مواد بپرهيزد .

توضيحات عمومي:

1- قبل از شروع مراحل آزمايش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق رسانده و به خوبي تکان دهيد تا کاملا" يکنواخت شوند.
2- بهتراست به محض شروع آزمايش کليه مراحل بدون توقف انجام پذيرند .
3- ازنوك سمپلر يك بار مصرف براي هر نمونه استفاده کنيد .
4- پس از افزودن محلول متوقف کننده ، جذب نوري چاهکها حداکثر تا نيم ساعت قابل قرائت مي باشد .
5- براي کسب نتايج مطلوب بايد شستشوي چاهکها بصورت کامل صورت گرفته وآخرين قطرات پس از شستشو از چاهکها تخليه شوند .
6- از مهمترين فاکتورها در حصول نتيجه مطلوب ، زمان انکو باسيون مناسب مي باشد ، بنابراين پيشنهاد مي گردد قبل از شروع آزمايش تمام مواد و محلولهاي مورد نيازرا آماده نموده و درب محلولهاي مورد نياز را باز کنيد ، اين عمل با کاهش فاصله زماني بين مراحل سمپلينگ باعث نتايج دقيقتري ميشود.
7- بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد وزمان ريختن نمونه ها پيش از5دقيقه به طول نيانجامد .

مراحل انجام آزمايش :

1- تعداد چاهکهاي مورد نظر را انتخاب نموده و باقي چاهکها را به همراه نمگير درون کيسه مخصوص نگهداري پليت قرار داده و درب آن را ببنديد .
2- 50 ميکروليتر از هر استاندارد ، سرم کنترل و نمونه را به داخل هر چاهك بريزيد ، سپس پليت را به آرامي به مدت 15 ثانيه تکان دهيد تا محتويات آن بخوبي مخلوط شوند ، پيشنهاد مي گردد که از استانداردها و نمونه ها به صورت داپليکيت استفاده شود بدين معني که هر استاندارد و نمونه را در دوچاهك بريزيد و در انتها از ميانگين جذب نوري آنها براي محاسبه نتايج استفاده کنيد سپس 50 ميکروليتر محلول اسی بافر(Assay buffer) را به داخل هر چاهک بريزيد وبراى 15 ثانيه پليت را تکان دهيد تا محتويات چاهکها خوب مخلوط شوند و آنگاه درب چاهکها را با بر چسب مخصوص پليت پوشانده و چاهکها را به مدت 30 دقيقه در درجه حرارت اتاق(22-28 درجه) انکوبه نمائيد.
3- درادامه بدون اينکه چاهکها را شستشو دهيد 50 ميکرو ليترمحلول (Enzyme Conjugate) آنزيم کونزوگه به هرچاهك اضافه نمائيد وبراى 15 ثانيه پليت را تکان دهيد تا محتويات چاهکها خوب مخلوط شوند و آنگاه درب چاهکها را با بر چسب مخصوص پليت پوشانده و چاهکها را به مدت 30 دقيقه در درجه حرارت اتاق(22-28 درجه) انکوبه نمائيد.
4- محتويات چاهکها را خالي کرده و چاهکها را 5 بار با محلول شستشوي آماده مصرف بشوئيد (براي شستشو مي توان از سمپلر 8 کاناله استفاده نمود ولي بايد مواظب بود که محلول شستشو از يك چاهك به چاهك ديگر وارد نشود زيرا مي تواند موجب ايجاد خطا در نتيجه آزمايش گردد). در هر دفعه شستشو حدود 300 ميکروليتر محلول شستشو در هر چاهك ريخته و سپس چاهك ها را درحالت وارونه و با ضربات ملايم بر روي يك پارچه يا کاغذ نمگير بکوبيد تا قطرات اضافي محلول شستشو خارج شوند.
5- 100 ميکروليتر محلول رنگزا (Chromogen – Substrate) به هرچاهك اضافه نمائيد و چاهکها را به مدت 15 دقيقه در درجه حرارت اتاق و درتاريکي انکوبه نمائيد .
6- با اضافه کردن 100 ميکروليتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هرچاهك ادامه واکنشهاي آنزيمي را متوقف نمائيد . براي سنجش جذب نوري هرچاهك از دستگاه الايزا ريدر با فيلتر 450 nm استفاده نمائيد .(توصيه مي شود از فيلتر 630 nm به عنوان فيلتر رفرانس استفاده گردد.)

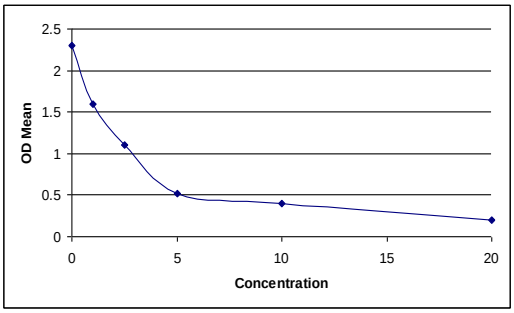
شرايط نگهداري فرآورده تشخيصی:

1- دماي نگهداري کيت بين 2-8 C' مي باشد و بهتراست که در 4C ' نگهداري شود .
2- با توجه به انجام تست هاي accelerate , Full Term اين کيت درصورت رعايت موارد نگهداري صحيح تا 12 ماه پايدار مي باشد ودر اين مدت کيت حاضر بالاي 90 درصد کارايي اوليه را داراست. با توجه به آزمايشات انجام شده در صورت باز نمودن کيت يک ماه پايدار می باشد .
3- چاهکها را در کيسه مخصوص پليت همراه با نمگير نگهداري نمائيد .
4- **توجه:** درصورت بازشدن درب کيت و محلول ها تازماني که آلودگي ميکروبي و قارچي رخ ندهد کيت پايدار خواهند بود.

محاسبه نتايج :

1- جذب نوری استاندارد ها و نمونه ها را به کمک دستگاه Eliza Reader در طول موج nm450 و در صورت امکان در مقابل فيلتر رفرانس nm630 بخوانيد.
2- با استفاده از ميانگين جذب نوری استاندارد ها و غلظت معلوم آنها نموداری Point To Point رسم کنيد ،به اين 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 آوريد ،در ادامه نقاط بدست آمده را به يکديگر وصل نمائيد تا منحنی بدست آيد.
3- ميانگين جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن را پيدا کنيد ، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمائيد بطوريکه اين خط کاملا بر محور عمودی عمود باشد و در ادامه از محل تلاقی خط و منحنی ،خطی عمود بر محور افقی وارد کنيد ، نقطه تلاقی اين خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد.

	استانداردها Pg/ml	OD 450/630
St 1	0	2.3
St 2	1.0	1.6
St 3	2.5	1.1
St 4	5.0	0.52
St 5	10	0.4
St 6	20	0.2



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.

شاخصهاي اجرائي:

1- حداقل مقدار قابل اندازه گيري :

براساس جذب نوري استاندارد صفر ومنهای سه برابر انحراف معیار (SD)حداقل غلظت FREE T3 قابل تشخیص در این کیت 0.5 pg/ml مي باشد.

2- ريكاوري آزمايش :

مقادير معلومي از FREE T3 به 4 سرم با غلظتهاي مشخص FREE T3 افزوده شد و ريكاوري آنها محاسبه گرديد كه نتايج آن در جدول صفحه بعد آمده است.

جدول ريكاوري :

ريكاوري (%)	مقدار بدست آمده (pg/ml)	مقدار مورد انتظار (pg/ml)	مقدار افزوده شده FREE T3 (pg/ml)	مقدار FREE T3 موجود درسرم (pg/ml)	نمونه
87	0.7	0.8	1	0.6	1
116	2.1	1.8	3	0.6	1
107	4.1	3.8	7	0.6	1
91	1.1	1.2	1	1.4	2
109	2.3	2.1	3	1.4	2
95	4.0	4.2	7	1.4	2
84	1.95	2.3	1	3.6	3
90	3	3.3	3	3.6	3
96	5.1	5.3	7	3.6	3
89	3.45	3.85	1	6.7	4
94	4.6	4.85	3	6.7	4
90	6.2	6.85	7	6.7	4

3- دقت آزمايش :

آزمايشهاي اينترا- اسي (همخواني غلظت مشخص از يك نمونه در يك سري آزمايش) و اينتر- اسي (همخواني غلظت مشخص ازيك نمونه در سري آزمايشهاي مختلف) بااستفاده از4 استاندارد با غلظتهاي مختلف FREE T3 انجام گرديد كه در جداول 1و2 آمده است .

جدول شماره 1 (اينترا- اسي)

CV%	SDpg/ml	ميانگين pg/ml	تعداد دفعات تكرار	نمونه
8.1	0.167	0	12	1
8.3	0.125	1.0	12	2
6.8	0.24	2.5	12	3
9.0	0.08	5.0	12	4

جدول شماره 2 (اينتر- اسي)

نمونه	تعداد دفعات تکرار	pg/ml ميانگين	SD pg/ml	CV%
1	5	0	0.155	7.7
2	5	1.0	0.112	6.5
3	5	2.5	0.90	5.1
4	5	5.0	0.27	8.6

هرسري آزمايش بصورت Duplicate انجام شده است .

4- اختصاصيت آزمايش :

اختصاصيت اين آزمايش به كمك سرمهايي با غلظتهاي مختلف ,L-Thyroxine, Phenylbutazone, Diiodothyrosine ,Iodothyrosine Diiodothyronine جهت بررسي واكنشهاي متقاطع با FREE T3 بررسي شد كه نتايج آن در جدول زير آمده است .

جدول اختصاصيت (واكنش متقاطع) :

آناليت	غلظت(µg/ml)	غلظت ظاهري FREE (pg/ml) T3
Iodothyrosine	10	<0.5
Diiodothyrosine	10	<0.5
Diiodothyronine	10	<0.5
L-Thyroxine	10	<0.5
Phenylbutazone	10	<0.5

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