

کیت رادیوایمونواسی تعیین مقدار برداشت هورمون T3 انسانی

T3-Uptake RIA Kit

مقدمه

این کیت برای تعیین کمی میزان برداشت پروتئین های س رم از هورمون های تیروئیدی در سرم انسانی طراحی شده است. هورمون های تیروکسین (T4) و تری یدوتیرونین (T3) عمدتاً به پروتئین های خاصی در سرم متصل می شوند، که بعنوان حامل این هورمون ها در جریان خون عمل می کنند. دو پروتئین عمده عبارتند از Thyroxine Binding Globulin (TBG) و آلبومین. درصد بسیار کمی از این هورمون ها بصورت آزاد در جریان خون وجود دارند که این قسمت عامل فعالیت های بیولوژیکی این هورمون ها می باشد. مقدار آزاد هورمون های تیروئیدی نسبت عکس با مقدار متصل شده به پروتئین های سرم دارد. بیماران مبتلا به پرکاری تیروئید غلظت های بالایی از هورمون های تیروئیدی دارند لذا پروتئین های سرم این افراد نسبت به افراد طبیعی اشباع تر می باشند. بالعکس افراد مبتلا به کم کاری تیروئید، غلظت های کمتری از هورمون های تیروئیدی را داشته لذا پروتئین های سرم این افراد نسبت به افراد طبیعی کمتر اشباع می باشد. در برخی حالات پاتولوژیک غلظت پروتئین های سرم افزایش می یابد که در نتیجه آن غلظت تام هورمون های تیروئیدی افزایش می یابد، در حالیکه عملکرد تیروئید طبیعی است. لذا تعیین مقدار برداشت هورمون های تیروئیدی (T-Uptake) همراه با تعیین مقدار تام هورمون های تیروئیدی در شرایط خاص نشانگر بهتری برای ارزیابی عملکرد تیروئید می باشد.

اساس روش اندازه گیری

کیت موجود بر اساس سنجش ایمونولوژیکی رادیواکتیو رقابتی تهیه شده است. لوله ها توسط آنتی بادی علیه T3 پوشش داده شده اند. در این روش ابتدا استاندارد، سرم کنترل و یا سرم نمونه داخل لوله ریخته می شود. سپس رادیواکتیو که محتوی T3 متصل به ید-125 می باشد، به لوله ها اضافه می شود و مجموعه مخلوط می گردد. هورمون T3 رادیواکتیو موجود در مجموعه برای اتصال به آنتی بادی پوشش داده شده و ظرفیت خالی پروتئین های سرم رقابت می کند. پس از زمان انکوباسیون، لوله ها تخلیه می شوند. سپس اکتیویته موجود در هر لوله توسط شمارنده گاما اندازه گیری می شود که این اکتیویته بطور معکوس با مقدار برداشت در نمونه ها متناسب است. استاندارد T3-uptake با درصد مشخص، همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند

که بر اساس مقدار برداشت اکتیویته در استاندارد، مقدار برداشت نمونه های مجهول بدست می آید.

معرف ها

- لوله های پوشش داده شده: شامل ۱۰۰ لوله که با آنتی بادی ضد T3 تهیه شده در خرگوش پوشش داده شده اند.
- ردیاب T3-up take: یک ویال ۳۵ میلی لیتری آماده مصرف.
- استاندارد: یک ویال یک میلی لیتر که در سرم نرمال انسانی تهیه شده و از تیومرسال بعنوان نگهدارنده استفاده شده است که درصد مقدار برداشت در برگه کنترل ذکر شده است.
- سرم کنترل: یک ویال لیوفیلیزه که باید با ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر تهیه شود.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست

- سمپلرهای ۲۵ و ۳۰۰ میکرولیتری دقیق
- آب دیونیزه
- دستگاه گاما کانتر
- کاغذ جاذب رطوبت
- لوله های آزمایش معمولی برای شمارش تام

نکات قابل توجه برای مصرف کنندگان

- در این کیت از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر HIV و HbsAg منفی بوده اند.
- از استفاده از مواد پس از تاریخ انقضاء خودداری کنید و از مخلوط کردن یا استفاده از کیت ها با شماره بچ مختلف پرهیز نمایید.
- درب ظروف را پس از استفاده ببندید و از تعویض درب ها جدا خودداری کنید.
- از لباس و دستکش یکبار مصرف هنگام کار با مواد رادیواکتیو استفاده کنید.
- لوازم آزمایشگاهی آلوده به مواد رادیواکتیو جداگانه و با روش های ایمن (براساس دستورالعمل های حفاظت در برابر اشعه) شستشو و یا پسماند نماید.

تهیه و جمع آوری نمونه :

- آزمایش را باید بر روی نمونه های سرمی انجام داد. نمونه های شدیداً همولیزه و دارای چربی باح حذف شوند.

محاسبه نتایج

۱- با استفاده از میانگین شمارش استاندارد و نمونه و با کمک فرمول زیر درصد برداشت را در نمونه های مجهول بدست آورید.

$$\text{درصد برداشت T3 (\%T3 up take)} = \frac{\text{میانگین شمارش در لوله نمونه}}{\text{میانگین شمارش در لوله استاندارد}} \times 30$$

مقادیر طبیعی

بدلیل اختلافات سنی، نژادی و رژیم تغذیه، نمی توان برای تمام جمعیت ها محدوده مرجع تعیین کرد. بنابراین هر آزمایشگاه باید محدوده مرجع خود را گزارش نماید. درصد برداشت مقادیر طبیعی در سرم افراد نرمال که توسط آزمایشات مکرر به روش رادیوایمونواسی بدست آمده است به قرار زیر می باشد :

محدوده طبیعی ۲۵ - ۳۵ درصد

خصوصیات کیت

۱- دقت

برای محاسبه میزان دقت در یک روز و روزهای مختلف، آزمایش بر روی ۳ نمونه سرم ۲۰ بار تکرار شد که ضریب تغییرات به شرح ذیل است.

ضریب تغییرات در روز

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (%)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
1	20	20.4	1.37	6.7
2	20	31.1	1.62	5.2
3	20	47.2	1.70	3.6

ضریب تغییرات در روزهای مختلف

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (%)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
1	10	21.5	1.55	7.2
2	10	30.0	1.83	6.1
3	10	47.0	2.63	5.6

۲- نمونه ها را می توان برای دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد و برای زمان های طولانی تر (تا سی روز) در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمود.

۳- از انجماد و ذوب مکرر نمونه ها باید خودداری کرد.

۴- معرف ها باید مستقیماً به لوله ریخته شوند.

۵- از تماس نوک سمپلر با ته لوله خودداری کنید.

آماده سازی معرف ها

۱- کلیه معرف ها را به دمای اتاق برسانید. قبل از استفاده آنها را به آرامی سروته نمائید.

روش انجام آزمایش

۱- تعداد لوله های کوت شده برای استاندارد، کنترل ها و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید. برای شمارش تام از لوله های معمولی استفاده کنید.

۲- ۲۵ میکرولیتر از استاندارد، کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر لوله بریزید.

۳- ۳۰۰ میکرولیتر از ردیاب را به تمام لوله ها اضافه کنید.

۴- لوله ها را بمدت ۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات آنها خوب مخلوط شوند. سپس لوله ها را بمدت دو ساعت در همزن گردان مخصوص شرکت پادتن گستر ایثار یا در شیکر افقی (با دور 280rpm) و در درجه حرارت اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتیگراد) انکوبه کنید.

۵- محتویات لوله ها را از طریق مکش یا وارونه کردن تخلیه نمایید (بجز لوله های شمارش تام). برای اطمینان از تخلیه کامل، با وارونه نگهداشتن لوله ها بروی کاغذ جاذب و با ضربات ملایم بر روی لوله تمامی مایع موجود در لوله ها را تخلیه نمائید.

۶- با استفاده از گاما کانتر، اکتیویته موجود در لوله ها بمدت یک دقیقه شمارش کنید.