

**OPTIMISATION AND APPLICATION OF SERUM  
TRIIODOTHYRONINE (T<sub>3</sub>)  
BY SOLID-PHASE ANTIBODY**



**DUSIT ROONPHO**

With compliments  
of

*ศาสตราจารย์พิเศษ ดร.วิจิตร*

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
(RADIOLOGICAL SCIENCE)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

**1998**

**ISBN 974-661-465-7**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

Copyright by Mahidol University

คูสิต หุ่นโพธิ์: การพัฒนาปรับปรุงและการประยุกต์ใช้ สิริม ไตรไอโอโดทัยโรนิน (ที 3) โดยวิธีโซลิด-เฟส แอนติบอดี (OPTIMISATION AND APPLICATION OF SERUM TRIIODOTHYRONINE (T<sub>3</sub>) BY SOLID - PHASE ANTIBODY). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วิชา บุญนาศิริ Ph.D., ประไพพิศ สุปรารภ M.Sc. 64 หน้า. ISBN 974-661-465-7

เทคนิคการแยกส่วนของเบานด์ออกจากส่วนของแอนติเจนอิสระ มักเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์ทางอาร์.ไอ.เอ.วิธีการแยกโดยใช้ผงแม่เหล็ก (แมกเนติก โซลิด-เฟส อาร์.ไอ.เอ.) เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และใช้เวลาในการแยกเพียงไม่กี่นาที ดังนั้นในการศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาและปรับปรุงวิธีการทางอาร์.ไอ.เอ. แบบแมกเนติก โซลิด-เฟส สำหรับใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสิริมที 3 ใช้แมกเนติก เซลลูโลส ขนาด 20-40 ไมครอน ทำปฏิกิริยากับ 1,1'-คาร์โบนิลไดอิมิดาโซล (CDI) แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับ ที 3 - แอนติบอดี ในอัตราส่วน 1 : 10 ที่อุณหภูมิห้อง (20-25°C) โดยใช้เครื่องให้มีการผสมกันนาน 48 ชั่วโมง จะได้อิมูโนแอกซอร์เบนท์ หรือ ที 3 - แอนติบอดีที่เกาะติดบนพื้นผิวของแมกเนติกเซลลูโลส ขั้นตอนต่างๆ ในการเตรียมไม่ยาก ให้ผลสม่ำเสมอและไม่ค่อยมีอันตราย ได้ทดสอบความมีเสถียรภาพของอิมูโนแอกซอร์เบนท์ ซึ่งเก็บไว้ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ที่อุณหภูมิ 4°C พบว่าอายุการใช้งานได้นานถึง 15 เดือน

การเลือกสารต่างๆที่ใช้ เวลาที่เหมาะสมในการอินคิวเบชัน และการพัฒนาปรับปรุงขั้นตอนการวิเคราะห์ล้วนเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การตรวจวิเคราะห์มีประสิทธิภาพสูงสุด ผลการทดลองพบดังนี้ ความเข้มข้นของอิมูโนแอกซอร์เบนท์ ใช้หลอดละ 0.15 มก., ANS 2.0 มก./มล., BSA เข้มข้น 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ Triton X-100 0.2% (ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งถูกนำมาใช้ตลอดการศึกษานี้ ใช้เวลาในการอินคิวเบชัน 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทำการแยกส่วนของเบานด์ออก โดยใช้วิธีการแยกแบบพลังสนามแม่เหล็กจะได้กราฟมาตรฐานที่ดีที่สุด

เพื่อที่จะตรวจสอบคุณภาพการวิเคราะห์จึงได้ทำการทดสอบความไว, ความแม่นยำ, ความถูกต้อง, ความจำเพาะเจาะจง, precision profile และ drift test จากการประเมินผล พบว่าคุณภาพของแอสเสย์ให้ผลเป็นที่น่าพอใจมาก ได้ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างวิธีใช้แมกเนติก โซลิด-เฟส และวิธีชาร์โคล พบว่าทั้งสองวิธีมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ดีมาก ( $r = 0.993$ ) ฉะนั้น อาร์.ไอ.เอ.ที่ใช้แมกเนติก โซลิด-เฟส ที่พัฒนาและปรับปรุงได้นี้ เป็นวิธีที่มีราคาถูก ทำได้ไม่ยาก รวดเร็ว มีความแม่นยำ มีความไว และความจำเพาะเจาะจงสูงในการวิเคราะห์หาปริมาณที 3 รวมในสิริม จึงนำวิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้ มาประยุกต์ใช้หาพิสัยปกติของที 3 รวมในกลุ่มผู้ใหญ่ที่มีภาวะต่อมธัยรอยด์ปกติจำนวน 286 คน ซึ่งมีค่าพิสัยปกติอยู่ระหว่าง 75-173 นนก/คค. โดยค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ  $123.8 \pm 24.5$  นนก/คค. สามารถแยกภาวะต่อมธัยรอยด์ปกติ ออกจากผู้ป่วยฮัยโปธัยรอยด์, ฮัยเปอร์ธัยรอยด์ และที 3 - ท็อกซิโคซิส ได้ชัดเจนดีมาก (ที < 0.0005) นอกจากนี้ยังพบว่า ค่าเฉลี่ยสิริม ที 3 ในผู้สูงอายุจากกรุงเทพมหานคร ( $112.6 \pm 25.5$  นนก/คค. และจากจังหวัดอุบลราชธานี ( $113 \pm 24.6$  นนก/คค.) มีค่าต่ำกว่าค่าเฉลี่ยในธัยรอยด์ปกติของผู้ใหญ่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ที < 0.0005)

เทคนิคที่ใช้ผงแม่เหล็กนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอาร์.ไอ.เอ.อื่นๆได้มากมาย และเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบบอิมูโนราดิโอเมตริกแอสเสย์ ซึ่งจะช่วยในการวินิจฉัยโรคต่างๆ ของต่อมไร้ท่อได้ดียิ่งขึ้น ดังนั้นการตรวจหาที 3 โดยวิธีโซลิด-เฟส จึงเป็นประโยชน์ทั้งต่อการวินิจฉัยโรคทางคลินิก และการประเมินภาวะการทำหน้าที่ทางสรีรวิทยาของต่อมธัยรอยด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่เรียกว่าที 3 - ท็อกซิโคซิส.

3737031 SIRS/M : MAJOR : RADIOLOGICAL SCIENCE ;  
: M.Sc. (RADIOLOGICAL SCIENCE)  
KEY WORD : TRIIODOTHYRONINE / RADIOIMMUNOASSAY /  
MAGNETIC SOLID - PHASE / EUTHYROID /  
HYPERTHYROID / HYPOTHYROID / T<sub>3</sub> - TOXICOSIS  
DUSIT ROONPHO : OPTIMISATION AND APPLICATION OF  
SERUM TRIIODOTHYRONINE (T<sub>3</sub>) BY SOLID - PHASE ANTIBODY.  
THESIS ADVISOR : VIPA BOONNAMSIRI, Ph.D., PRAPAIPIT SUPRAROP,  
M.Sc. 64 p. ISBN 974-661-465-7

Separation of the bound antigen - antibody complex from the free fraction is one of the major sources of error in an RIA test. Solid - phase RIA by magnetic particle method has been shown to be simple and rapid, requiring a few minutes to complete separation. Therefore, the object of this study is to devise, in - house develop and optimise a solid - phase RIA for serum T<sub>3</sub>. Twenty to forty microns of magnetic cellulose particles which were activated with 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI). Neat T<sub>3</sub> - antiserum was then coupled to the CDI - activated magnetic cellulose in the ratio of 1 : 10 (v/w) at room temperature (20 - 25 °C) for 48 hrs with continuous mixing, producing the immuno-adsorbent or immobilisation of T<sub>3</sub> - antibody on the surface of magnetic cellulose. The activation and coupling procedure was found to be easy to prepare, reproducible and less hazardous than cyanogen bromide method. Stability of the immuno-adsorbent in phosphate buffer pH 7.4 at 4 °C was examined at various time intervals up to 15 months.

Selections of reagents, correct incubation time and optimisation of the assay protocol are important factors in achieving satisfactory assay performance. Under optimised conditions, concentrations of 0.15 mg immuno-adsorbent / tube, 2.0 mg ANS/ml, 0.2 % BSA (w/v) and 0.2 % Triton X -100 (v/v) were used throughout this study. Magnetic separation was carried out after 4 hrs incubation at ambient temperature to accomplish the best fitting curve.

In order to monitor validation of assay techniques, QC profiles in details such as sensitivity, precision, accuracy, specificity, precision profile and drift effect were evaluated and satisfactory results were obtained. Correlation coefficient (r) between the solid - phase RIA and the charcoal separation as a reference method was excellent (r = 0.993). Thus inexpensive, simple, rapid, precise, sensitive and specific RIA for total serum T<sub>3</sub> was established and adopted. This solid - phase RIA was applied to get the normal range of 75 - 173 ng/dl with the mean ( $\pm$  SD) of 123.8  $\pm$  24.5 ng/dl from 286 adult euthyroid subjects, yielding very good discrimination (p < 0.0005) between euthyroids and patients with hypothyroid, hyperthyroid and T<sub>3</sub> - toxicosis. Moreover, the mean values of serum T<sub>3</sub> in aging euthyroids from Bangkok (112.6  $\pm$  25.5 ng/dl) and Ubonrajchathani (113  $\pm$  24.6 ng/dl) provinces were significantly lower (p < 0.0005) than in adult euthyroids.

The magnetic particle technique can be universally applied in many RIAs (limited reagent immunoassays) and is also ideally suited to immunometric assays (excess reagent immunoassays), when may lead to improvement in the diagnosis of endocrinopathies. Therefore, measurements of serum T<sub>3</sub> by solid - phase should be a useful adjunct to both clinical diagnosis and physiological evaluation of thyroid functions, especially suspected T<sub>3</sub> - toxicosis.