کیت سنجش Ferritin به روش الایزا

مقدمه :

مولکول فریتین با وزن ملکولی ۴۵۰ کیلو دالتون مهمترین پروتئین ذخیره کننده آهن بدن می باشدکه در بافتهای مختلف بدن از جمله کبد، طحال و مغز استخوان وجود دارد. این مولکول دارای ۲۴ زیر واحد پروتئینی است که یک پوسته تقریباً کروی را تشکیل داده و در مرکز آن حفره خالی ایجاد شده توسط حداقل ۴۰۰۰ اتم آهن در حالت محلول ، غیر سمی و قابل دسترس اتصال می یابد. این میزان آهن حدود ۱٪ از آهن پلاسما را در بر می گیرد. آهن موجود در فریتین مهمترین و اختصاصی ترین فرم آهن ذخیره ای در سلولهاست که در هنگام کمبود آهن به تدریج آزاد می شود. میزان فریتین در بدو تولد بالا بوده و به تدریج کاهش می یابد و در دوران کودکی در همان سطح باقی می ماند، پس از بلوغ میزان آن شروع به افزایش می کند و در آقایان بیشتر از خانم ها خواهد بود. میزان فریتین سرم یک پارامتر واقعی از میزان آهن ذخیره است و با آن ارتباط مستقیم دارد، میزان فریتین در طی بیوریتم ثابت است در حالیکه میزان آهن دستخوش تغییرات گسترده می شود، بنابراین اندازه گیری فریتین در سرم انعکاسی از میزان آهن در بدن است بطوریکه به موازات کاهش آهن در فقر آهن، کاهش و در بیماری انباشتگی آهن، افزایش می یابد. اندازه گیری فریتین در تشخیص بیماری کم خونی ناشی از فقر آهن و کنترل درمان شاخص بسیار دقیق و حساسی است و در شرایط پر خطر نظیر بارداری، دیالیز و دهندگان حرفه ای خون توصیه می شود، میزان فریتین در برخی از بیماریها نظیر همو کروماتوز ، آنمی ناشی از بیماریهای مزمن، آنمی همولیتیک نظیر تالاسمی، بیماریهای کبدی، بدخیمی ها و التهابات افزایش می یابد .

اساس آزمایش:

اساس این کیت به روش ساندویچ و با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادیهایی برعلیه یک شاخص آنتی ژنیک Ferritin پوشش داده می شوند (Coating). نمونه بیماران با آنتی بادی پوشش داده شده در ته چاهکها مجاور می شود. پس از انکوباسیون و شستشو، آنتی بادی ثانویه ضد Ferritin متصل به آنزیم HRP به چاهکها اضافه شده و انکوبه میگردد که مقدار کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها با غلظت Ferritin در نمونه ها متناسب است. پس از شستشو محلول رنگزا که محتوی هیدروژن پراکسید (H2O2) وکروموژن است به داخل چاهکها ریخته می شود که رنگ آبی پدید آمده متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها است، با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد .

محتویات کیت :

۱) پلیت ۹۶ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد فریتین (Anti - Ferritin Coated Plate) .
۲) محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۳) سری استانداردها (Standard Set) : شامل ۷ ویال استاندارد با غلظتهای ۰، ۱۰، ۲۵، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ ng/ml فریتین کالیبره شده در مقابل WHO 3rd IS 94/572 (استاندارد صفر محتوی۲ میلی لیتر و سایر استانداردها حاوی ۱ میلی لیتر می باشند) .
۴) سرم کنترلهای بالا و پایین : دو ویال هر یک حاوی ۱ میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب هر ویال .
۵) محلول اسی بافر (Assay Buffer) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۶) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۷) محلول شستشو : یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۲۰X) . جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف ، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید .
۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution): یک ویال حاوی ۱۲میلی لیتر .
۹) برچسب مخصوص پلیت .

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند :

۱) دستگاه الایزاریدر با طول موج ۴۵۰ نانومتر و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر .
۲) سمپلر های ۵۰ و ۱۰۰ میکرو لیتری دقیق .
۳) آب مقطر .

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان:

۱) محتویات این کیت برای مصرف در همین کیت تعبیه شده است .
۲) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش چهارم – اردیبهشت ۹۲

۳) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg و آنتی بادی های ضد HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند، جهت احتیاط بهتر است هر پرسنلی که با کیت کار می کند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزد .

شرایط نگهداری :

۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید .
۲) چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید .
۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضاء نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد .
۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۸-۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد .

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم یا پلاسما را می توان پس از جدا نمودن ازخون استفاده نمود، نمونه را می توان به مدت دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و یا برای مدت زمان طولانی تر (ماکزیمم تا ۳۰ روز) در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری نمود (در ضمن باید از Freeze-thaw نمودن نمونه پرهیز شود) .

توضیحات عمومی :

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق رسانده و بخوبی تکان دهید تا کاملاً یکنواخت شوند .
۲) بهتر است به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند .
۳) از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید .
۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده جذب نوری چاهکها حد اکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .
۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند .
۶) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب زمان انکوباسیون مناسب می باشد، بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب محلولهای مورد نیاز را باز کنید ، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیقتر می شود .
۷) به دلیل مشابه در بند ۶ بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه ها بیش از ۵ دقیقه بطول نیانجامد .

مراحل انجام آزمایش :

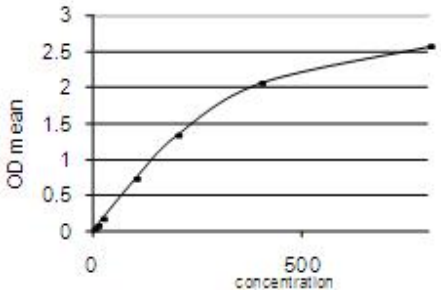
۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب نموده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .
۲) ۵۰ میکرولیتر از هر استاندارد ، سرم کنترل و نمونه را به داخل هر چاهک بریزید، پیشنهاد می گردد که از استانداردها و نمونه ها بصورت داپلیکیت استفاده شود بدین معنی که هر استاندارد و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید .
۳) ۱۰۰میکرولیتر از محلول اسی بافر (Assay Buffer) را به هر چاهک اضافه نموده و پلیت را به آرامی به مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات آن بخوبی مخلوط شوند درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۸ - ۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید .
۴) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (برای شستشو می توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد، در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو چاهکها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بزنید تا قطرات اضافی خارج شوند) .
۵) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) را به هر چاهک اضافه نموده درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۸ – ۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید .
۶) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (همانند بند ۴) .
۷) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) : به هر چاهک اضافه نمایید .
۸) چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید .
۹) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (stop solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید . برای سنجش جذب نوری از دستگاه الایزاریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نمایید (توصیه می شود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد) .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش چهارم – اردیبهشت ۹۲

محاسبه نتایج :

از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm میتوان استفاده نمود .
۱) جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید .
۲) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آنها نموداری (Point to point) رسم کنید به این 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 آورید ، سپس نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی بدست آید .
۳) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن راپیدا کنید، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید بطوریکه این خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و بعد از محل تلاقی خط و منحنی ، خطی عمود بر محور افقی وارد کنید . نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد .

جذب نوری	استانداردها ng/ml
۰/۰۱۴	۰
۰/۰۷۲	۱۰
۰/۱۷۵	۲۵
۰/۷۳۰	۱۰۰
۱/۳۳۶	۲۰۰
۲/۰۶۲	۴۰۰
۲/۵۷۳	۸۰۰



توجه : جذبهای نوری و منحنی مربوطه فقط به عنوان نمونه می باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید .

مقادیر مورد انتظار :

مقادیر نرمال Ferritin درسرم افراد طبیعی که توسط تستهای مکرر به روش الایزا بدست آمده بقرار زیر می باشد ولی پیشنهاد می گردد که هر آزمایشگاه مقادیر طبیعی خود را بدست آورد :

	محدوده طبیعی برحسب واحد (ng/ml)
آقایان	۲۰ – ۳۰۰
خانمها قبل از یائسگی	۱۰ – ۱۰۰
خانمهای یائسه	۲۰ – ۲۰۰
نوزادان	۱۵۰ – ۵۰۰

شاخصهای اجرایی :

۱) حداقل مقدار قابل اندازه گیری :

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت Ferritin قابل تشخیص در این کیت ۱ ng/ml می باشد .

۲) دقت آزمایش :

آزمایشهای اینترا– اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و اینتر– اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایشهای مختلف) با استفاده از ۳ سرم با غلظتهای مختلف Ferritin انجام گردید که در جداول ۱ و ۲ آمده است :

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

جدول شماره ۱ (اینترا-اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین(ng/ml)	SD	% CV
۱	۲۴	۱۶/۵	۰/۶	۳/۶
۲	۲۴	۳۶۵	۱۱/۷	۳/۲
۳	۲۴	۵۸۵	۳۲	۵/۵

جدول شماره ۲ (اینتر-اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین(ng/ml)	SD	% CV
۱	۱۰	۲۰/۳	۱/۲	۵/۹
۲	۱۰	۳۷۲	۱۸/۷	۵
۳	۱۰	۵۶۶	۵۲/۶	۹/۳

هر سری آزمایش بصورت Duplicate انجام شده است .

۳) ریکاوری آزمایش :

مقادیر معلومی از Ferritin به ۴ سرم با غلظتهای مشخص Ferritin افزوده شد و ریکاوری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول زیر آمده است :

نمونه	مقدارFerritin موجود در سرم (ng/ml)	مقدارافزوده شدهFerritin (ng/ml)	مقدار مورد انتظار (ng/ml)	مقدار بدست آمده (ng/ml)	ریکاوری (%)
۱	۱۲	۱۰	۱۱	۱۰/۵	۹۵
۱	۱۲	۱۰۰	۵۶	۵۴	۹۶
۱	۱۲	۵۰۰	۲۵۶	۲۵۰	۹۷
۲	۴۴	۱۰	۲۷	۲۹	۱۰۷
۲	۴۴	۱۰۰	۷۲	۷۴	۱۰۳
۲	۴۴	۵۰۰	۲۷۲	۲۸۰	۱۰۳
۳	۱۵۲	۱۰	۸۱	۷۸	۹۶
۳	۱۵۲	۱۰۰	۱۲۶	۱۳۰	۱۰۳
۳	۱۵۲	۵۰۰	۳۲۶	۳۲۱	۹۸
۴	۴۱۶	۱۰	۲۱۳	۲۱۹	۱۰۳
۴	۴۱۶	۱۰۰	۲۵۸	۲۵۳	۹۸
۴	۴۱۶	۵۰۰	۴۵۸	۴۶۹	۱۰۲

۴) خطی بودن آزمایش :

به کمک استاندارد صفر رقتهای متوالی ۴ سرم با غلظت مشخص از Ferritin تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت محاسبه شد که در جدول زیر نتایج آن آورده شده است .

نمونه	مقدار Ferritin موجود در سرم رقیق نشده (ng/ml)	ریکاوری (%)			
		رقت ۱/۲	رقت ۱/۴	رقت ۱/۸	رقت ۱/۱۶
۱	۵۵۰	۱۰۶	۹۸	۱۰۱	۹۱
۲	۳۷۰	۱۱۲	۱۰۱	۹۶	۸۳
۳	۲۰۰	۱۰۹	۱۰۵	۹۵	۹۷
۴	۹۴	۹۸	۱۰۱	۱۰۳	۹۰

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱٤۹٤۷۳٤٤٦۳
تلفن ٤۲۱۹۷۰۰۰ فکس ٤۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش چهارم – اردیبهشت ۹۲

۵) اثر هوک (Hook Effect) :

آزمایش Ferritin جهت سرمهایی با غلظت بسیار بالا از این آنالیت (تا ۲۵۰ µg/ml) صورت گرفت که پدیده هوک مشاهده نشد .

References :

1-Cook J.D، Lipschitz D.A، Miles L.E.M and Finch CA. Serum Ferritin as a measure of iron stores in normal subject. Am J clin nutr، 1974; 27: 681

2-Beard J.L. Iron Biology in immune function muscle metabolism and neuronal functioing. J Nutr، 2001 ; 131 : 5685-5805

3-Dawson، DW et al. The accuracy and chemichal interpretation of serum ferritin assay. Clin Lab Haematol 1992; 14(1); 47-52

4-Powell، LW. et al. Diagnosis of hemochromatosis. Ann int med، 1998; 129: 925-31

روش انجام آزمایش Ferritin بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی بادی ضد Ferritin			
محلولها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
استانداردها	۵۰ میکرولیتر	–	–
سرم کنترل	–	۵۰ میکرولیتر	–
نمونه	–	–	۵۰ میکرولیتر
اسی بافر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
پلیت را به ملایمت برای مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهکها بخوبی مخلوط شوند و سپس دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید. ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۸–۲۲ °c) انکوبه کنید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید و طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .			
محلول کنژوگه	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید. ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۸–۲۲ °c) انکوبه کنید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنیدو طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید.			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید .			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید .			

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

ویرایش چهارم – اردیبهشت ۹۲