کیت اندازه‌گیری Ferritin در سرم انسان

Ferritin ELISA Kit 96t Cat. No: 0824-96
Brochure Rev: 07 (1399/04/14)

مقدمه:

کمبود آهن و در نتیجه کم خونی ناشی از آن، یکی از رایج‌ترین اختلالات بشر است. فریتین در خون و در بیشتر بافت‌ها، مهمترین پروتئین ذخیره کننده آهن می‌باشد. افزایش زیاد میزان آهن بدن (هموکروماتوز) منجر به افزایش ذخیره آن در فریتین می‌شود. اندازه‌گیری آهن، ظرفیت توتال اتصال آهن و دیگر مارکرهای مرتبط با آهن نظیر فریتین و ترانسفرین، از نظر کلینیکی بسیار مهم هستند. فریتین انسان، جرم مولکولی تغریبی معادل ۴۵۰۰۰۰ دالتون دارد و شامل یک بخش پروتئینی به نام آپوفریتین با ۲۴ زیر واحد می‌باشد که حدود ۴۵۰۰ اتم آهن را در خود ذخیره می‌کند. در شرایط نرمال، آهن فریتین ۲۵ درصد از کل آهن موجود در بدن را شامل می‌شود. در سیتوپلاسم سلول‌های سیستم رتیکولواندوتلیال (کبد، طحال و مغز استخوان) غلظت بالایی از فریتین وجود دارد. روش‌های اندازه‌گیری آهن در این بافت‌ها باعث آسیب به آنها شده و فاقد حساسیت لازم می‌باشند.

اندازه‌گیری فریتین در سرم جهت تعیین تغییرات ذخیره آهن بدن صورت می‌گیرد و مشکلات کمی برای بیمار ایجاد می‌کند. اندازه‌گیری میزان فریتین سرم معمولا جهت تشخیص زود هنگام آنمی ناشی از کمبود آهن، در بیماران به ظاهر سالم، انجام می‌شود. همچنین اندازه‌گیری فریتین سرم از نظر کلینیکی جهت تشخیص وضعیت آهن زنان باردار، اهدا کنندگان خون و بیماران دیالیزی نیز اهمیت دارد. مقادیر بالای فریتین ممکن است نشان‌دهنده مقادیر بالای آهن همراه با آسیب کبد آسیب ولی ظاهر سالم باشد که در مراحل اولیه idiopathic hemochromatosis رخ می‌دهد. سطح فریتین سرم جهت ارزیابی موارد مستقل از وضعیت آهن نظیر التهاب و بیماری‌های مزمن کبد نیز اندازه‌گیری می‌شود.

اصول آزمایش:

در این روش، اتصال کمپلکس‌های ایمنی در سطح چاهک‌های میکروپلیت از طریق واکنش بین استرپتاویدین (Streptavidin) کوت شده در کف چاهک‌ها وآنتی‌بادی مونوکلونال ضد فریتین متصل به بیوتین که به چاهک‌ها اضافه می‌شود، صورت می‌گیرد. به دنبال مخلوط شدن آنتی‌بادی متصل به بیوتین و سرم حاوی فریتین، کمپلکس ایمنی توسط بیوتین به استرپتاویدین متصل شده و ثابت می‌شود. در ادامه، پس از تخلیه و شستشوی اجزاء متصل نشده، آنتی‌بادی دیگری که با آنزیم HRP نشان دار شده است به سیستم اضافه می‌شود و کمپلکس ایمنی ساندویچی جدیدی ایجاد می‌گردد. پس از شستشوی مجدد چاهک‌ها، محلول رنگزا درون آنها ریخته شده که سوبسترای آنزیم HRP است و محصول آبی رنگی ایجاد می‌شود که پس از افزودن محلول متوقف کننده، به رنگ زرد تغییر رنگ می دهد. این محصول در طول موج ۴۵۰ نانومتر، بیشترین میزان جذب را دارد. شدت رنگ ایجاد شده و در نتیجه مقدار جذب با غلظت فریتین سرم، ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت فریتین سرم به کمک منحنی استاندارد (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

۱. میکرو پلیت Coat شد ه با استرپتاویدین ۹۶ تستی. بسته‌بندی شده در کیسه آلومینیومی همراه با رطوبت‌گیر.
۲. کالیبراتورهای Ferritin در مقادیر ۰، ۱۰، ۵۰، ۱۵۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ ng/ml، تهیه شده در سرم انسان.
۳. کونژوگه آنزیمی Ferritin: ۱ ویال ۱۱ میلی‌لیتری که حاوی آنتی‌بادی ضد Ferritin متصل به آنزیم HRP در بافر است.
۴. کونژوگه بیوتینی Ferritin: ۱ ویال ۱۱ میلی‌لیتری که حاوی آنتی‌بادی ضد Ferritin متصل به بیوتین در بافر است.
۵. محلول شستشو (۵۰x): ۱ ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
۶. محلول رنگزا A : ۱ ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۷. محلول رنگزا B : ۱ ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۸. محلول متوقف کننده واکنش: ۱ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۹. محلول کنترل: ۱ ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.
۱۰. بر چسب مخصوص پلیت: ۱ ورق.

توجه: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.

احتیاط در استفاده از کیت:

۱. محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جدا خودداری نمایید.
۲. کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آنها گذشته است، استفاده ننمایید.
۳. توجه فرمایید محلول‌ها در مجاورت نور و گرما قرار نگیرند.
۴. محتویات این کیت با منبع انسانی از نظر منفی بود HIV1/2 ، HBsAg و HCV تست شده‌اند. ولی هیچ روشی به طور کامل قادر به مشخص کردن منفی بودن موارد فوق نیست. بنابراین لازم است به صورت بالقوه آلوده در نظر گرفته شود و کار با آنها طبق دستورالعمل‌های ایمنی انجام شود.
۳. استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است و در هنگام کار با کیت دقت فرمائید که محتویات به صورت یا سایر نقاط بدن نپاشد و از تماس با دهان و سایر مخاط جداً خودداری گردد.

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه:

۱.گرفتن خون باید با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی انجام شود و به سرعت سرم از سلول‌های خونی جدا گردد.

از انجام تست بر روی نمونه‌های لیپمیک همراه با کدورت و همولیز خودداری نمائید. نمونه‌های پلاسما جهت انجام این تست مناسب نمی‌باشند.

۲. درب ظروف نمونه باید کاملاً بسته باشد و تا ۵ روز می‌توان آنها را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای مدت طولانی‌تر حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد.

آماده‌سازی معرف‌ها:

محلول شستشو: کل محتویات ویال محلول شستشو (۵۰x) را با ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کنید.

محلول رنگزا: ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را با ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B مخلوط نمایید. محلول فوق بعد از ۱۰ دقیقه قابل استفاده و برای ۲ ردیف کافی می‌باشد.

توجه: در صورت مشاهده رنگ آبی در محلول رنگزا و یا کدورت و رشد باکتری، از این محلول استفاده نشود.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش اطمینان حاصل کنید که کلیه کالیبراتورها، معرف‌ها و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند.

کلیه کالیبراتورها را با سر و ته کردن به آرامی مخلوط نمایید.

۱. تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را برداشته و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهدارید.
۲. ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت (Duplicate) در چاهک‌ها ریخته شود.

توجه: حتماً چاهک اول به عنوان بلانک در نظر گرفته شود. در این چاهک نمونه و یا کالیبراتور ریخته نشود. بقیه مراحل با سایر چاهک‌ها یکسان می‌باشد.

۳. ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه بیوتینی (Biotin Conjugate) به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴. چاهک‌ها را با چسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه (± ۵ دقیقه) در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵. محتویات پلیت را با وارونه کردن آن تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

۶. ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی (Enzyme Conjugate) به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۷. چاهک‌ها را با چسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه (± ۵ دقیقه) در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۸ محتویات پلیت را با وارونه کردن آن تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

۹. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

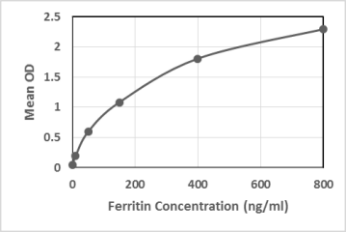
توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۱۰. ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده واکنش به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

۱۱. مقدار جذب را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید. (از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید).

میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrators	Well Number	Abs	Mean Abs	Value (ng/ml)
Cal A	A1	0.046	0.048	0
	B1	0.050		
Cal B	C1	0.191	0.194	10
	D1	0.198		
Cal C	E1	0.586	0.596	50
	F1	0.606		
Cal D	G1	1.061	1.085	150
	H1	1.109		
Cal E	A2	1.765	1.807	400
	B2	1.849		
Cal F	C2	2.213	2.293	800
	D2	2.373		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای Ferritin

Male	16 – 220 ng/ml
Female	10 – 124 ng/ml
Newborn	22 – 220 ng/ml
1 – 2 Months	190 – 610 ng/ml
2 – 5 Months	50 – 220 ng/ml
6 Months - 16 Years	10 – 160 ng/ml

پارامترهای کنترل کیفی

Intra - Assay

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری سه نمونه سرم در یک نوبت تست انجام گردید.

Serum sample	1	2	3
No.of Repeats	20	20	20
Mean Ferritin (ng/ml)	8.5	97	290
S.D (ng/ml)	0.41	3.5	13.4
C.V (%)	4.8	3.6	4.6

Inter - Assay

ارزیابی دقت بین‌تستی با سه نمونه متفاوت سرم در ۳ نوبت هر نوبت ۵ بار انجام شد.

Serum sample	1	2	3
No.of Repeats	15	15	15
Mean Ferritin (ng/ml)	12.4	74	240
S.D (ng/ml)	0.54	3.8	13.8
C.V (%)	4.3	5.1	5.7

Recovery

در این تست دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به عنوان یک نمونه، غلظت Ferritin در آن سنجش شد.

NO.	Sample (ng/ml)	Added (ng/ml)	Exp. (ng/ml)	Obs. (ng/ml(	Rec. (%)
1	14.7	43.5	29.1	27.5	94.5
2	34.6	85.2	59.9	61.2	102.2
3	183	62.8	122.9	119.2	97
4	17.4	56.2	36.8	34.9	94.8

Linearity

در این تست غلظت Ferritin در رقت‌های مختلف نمونه سرم جهت تعیین خطی بودن کیت، اندازه‌گیری شد.

NO.	Sample	1/2	1/4	1/8	1/16
		Recovery %			
1	27	97.4	97.6	101.9	99.2
2	65	95.1	97	95.5	97.6
3	120	104.3	102	98	97.7
4	250	99	96.3	98.7	98.2

Hook effect

غلظت Ferritin تا ۵۰۰۰۰ ng/ml بررسی گردید و اثر هوک مشاهده نشد.

Specificity

اختصاصیت این تست توسط اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مداخله‌گر به سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین مقدار ماده مداخله‌گر به مقدار Ferritin مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، سنجش شد.

Analyte	Cross Reactivity
Liver Ferritin	100%
Spleen Ferritin	100%
Heart Ferritin	<1.0%
Hemoglobin	<0.1%

Sensitivity

بر اساس جمع میانگین جذب نوری کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف معیار حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت ng/ml ۰/۳ می‌باشد.

References:

1. Beamish MR, et al, "Transferrin iron, chelatable iron and ferritin in idiopathic hemochromatosis" Br Jour Haematology 27, 219. (1974).
2. Anonymous, "Adult screening for anemia and hemoglobinopathies", Nurse Pract, 20, 48-51. (1995).
3. Corti MC, Gaziano M, Hennekens CH, "Iron status and risk of cardio-vascular disease", Ann Epidemiol, 7, 62-68. (1997).
4. Steiene-Martin EA. Lotspeich-Steininger CA., Koepke JA', Clinical Hematology: Principles, "Procedures, Correlations". 2nd ed. Lippinscott-Raven. Philadelphia. (1997).
5. Tietz N, Textbook of Clinical Chemistry, Carl A Burtis,3rd ed, WB Saunders, Philadelphia. (1999).

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

www.idealdiag.com
تهران - بزرگراه آبشناسان - سردارجنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۱۵
تلفن: ۲۳-۰۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹