کیت ایمونو آنزیماتیک (EIA) پادتن علم (۹۶ تستی)

FERRITIN

موارد استفاده:
تعیین کمّی Ferritin در سرم یا پلاسما

I. مقدمه

مولکول فریتین با وزن مولکولی ۴۵۰۰kDa ، بارزترین پروتئین ذخیره کننده آهن بدن محسوب می‌شود. این مولکول که ۴۰۰۰ اتم آهن را ذخیره می‌کند، حامل حدوداً ۱ ٪ آهن پلاسما است. در بدو تولد فریتین خون بالاست ولی به تدریج در چند ماه اول پس از تولد کاهش می‌یابد و در طول دوران کودکی در همان سطح باقی می‌ماند. معمولاً غلظت فریتین سرمی در سنین بلوغ دوباره افزایش می‌یابد [۱]. در افراد بالغ به طور طبیعی مقدار این پروتئین در آقایان بیش از خانمها است [۲]. غلظت فریتین پلاسما با غلظت آهن بدن ارتباط مستقیم دارد و بروز هر تغییری در ذخیره آهن بدن در غلظت فریتین پلاسما تأثیرگذار است [۳]. بنابراین در افراد عادی یا مبتلا به فقر آهن و همچنین بیمارانی که به انباشتگی آهن دچارند، می‌توان با اندازه‌گیری غلظت فریتین سرم، مقدار ذخایر آهن بدن را ارزیابی کرد. اگرچه متداول ترین روش تشخیص کم خونی فقر آهن، اندازه‌گیری غلظت آهن سرم و ظرفیت اتصال آهن است، ولی در تشخیص این نارسایی ها تعیین غلظت فریتین سرم شاخص دقیق‌تر و حساس‌تری است. غلظت فریتین سرم در بسیاری از بیماری‌های مزمن و همولیتیک نظیر تالاسمی، عفونت‌های مزمن، نارسایی‌های التهابی مزمن، بیماری‌های حاد یا مزمن کبدی [۴]، برخی از بدخیمی‌ها، بخصوص لوسمی حاد [۵]، بیماری هوچکین [۶]، و سرطان سینه [۷-۸] افزایش می‌یابد، همچنین برای پیگیری درمان انباشتگی آهن در بیماری‌هایی نظیر هموکروماتوز و تالاسمی از اندازه‌گیری غلظت فریتین استفاده می‌شود [۱۰ و ۹].

II. اصول اندازه‌گیری

کیت اندازه‌گیری کمّی فریتین بر مبنای سنجش واکنش ایمونوآنزیماتیک بر روی فاز جامد طراحی شده است. در این سیستم از دو آنتی بادی (مونوکلونال موش) که شاخص‌های آنتی ژنیک متمایزی را بر روی مولکول فریتین شناسائی می‌کنند، استفاده شده است. ابتدا به حفره‌های پلی استایرن پوشیده شده با آنتی بادی‌های مونو کلونال فریتین، استانداردها، سرم کنترل ها و نمونه‌های بیماران افزوده می‌شود.
در حین انکوباسیون اول، فریتین موجود در نمونه‌ها به آنتی‌بادی‌های ضد فریتین متصل و سپس بقیه مواد از طریق تخلیه و شستشو از سیستم خارج می‌شوند. پس از شستشو، آنتی‌بادی دوم ضد فریتین که به آنزیم پراکسیداز (HRP) متصل شده است به حفره‌ها افزوده می‌شود. بعد از دومین انکوباسیون و شستشو، با افزودن سوبسترای TMBو(۳ و ´۳ – ۵ و ´۵ تترامتیل بنزیدین) آنزیم رنگ آبی ایجاد می‌کند. شدت رنگ ایجاد شده با غلظت فریتین موجود در نمونه‌ها نسبت مستقیم دارد. رنگ‌زائی واکنش آنزیماتیک پس از افزودن محلول متوقف کننده خاتمه می‌یابد و رنگ آبی ایجاد شده به رنگ زرد تبدیل می‌شود. شدت رنگ با اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتراندازه‌گیری می‌شود.

برای تعیین غلظت فریتین نمونه‌ها ابتدا منحنی جذب نور استانداردها برحسب غلظت فریتین آنها رسم و سپس غلظت فریتین نمونه از روی منحنی استاندارد تعیین می‌شود.

III. محتویات کیت

محلولهای این کیت (Cat.No.P-FRI) برای انجام ۹۶ تست در نظر گرفته شده و تاریخ انقضای هر یک بر روی ویال آن درج شده است. دمای مناسب برای نگهداری کیت ۸-۲ درجه سانتی‌گراد است.

۱. **پلیت:** پلیت ۹۶ حفره‌ای پوشش داده شده با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال موشی ضد فریتین
۲. **استاندارد صفر:** ۱ ویال ۴ میلی‌لیتری. از استاندارد صفر برای رقیق کردن نمونه‌ها استفاده شود.
۳. **استانداردها:** ۶ ویال ۱ میلی لیتری محلول سرم دار حاوی فریتین انسان. غلظت‌های دقیق Ferritin استانداردها که برمبنای استاندارد سازمان بهداشت جهانی (IRP 80/602) کالیبر شده‌اند، روی برچسب آنها درج شده است. در محلول استانداردها از تیمروزال به عنوان نگهدارنده استفاده شده است.
۴. **کنترل‌های سرمی:** ۲ ویال ۱ میلی لیتری سرم انسانی حاوی تیمروزال. غلظت‌های دقیق فریتین کنترل‌های سرمی روی برچسب کنترل‌ها درج شده است.
۵. **ردیاب آنزیمی:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری آنتی‌بادی مونوکلونال ضد فریتین متصل به پراکسید از (HRP) محلول در بافر PBS، حاوی پروتئین و تیمروزال
۶. **بافر رقیق کننده:** یک ویال ۲۵ میلی لیتری محلول PBS،حاوی پروتئین و تیمروزال
۷. **محلول شستشوی غلیظ(۲۰x):** یک ویال ۲۵ میلی لیتری PBS Tween 20 و تیمروزال
۸. **محلول رنگ زا:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری بافر H_2O_2 و TMB
۹. **محلول متوقف کننده واکنش:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری H_2SO_4 دو نرمال

IV. وسایل مورد نیاز (این وسایل همراه کیت عرضه نمی‌شوند)

۱. دستگاه اسپکتروفتومتر میکروپلیت با دامنه جذب نوری ۳-۰ در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر
۲. میکروپیپت قابل تنظیم بر روی ۲۵ تا ۲۰۰ میکرولیتر و تیپ‌های یک بار مصرف

۳. آب مقطر یا آب دیونیزه برای رقیق کردن محلول شستشو

V. جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه مناسب برای اندازه‌گیری فریتین، سرم یا پلاسمای هپارینه بیمار است. این نمونه‌ها را تا دو هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد می‌توان نگهداری کرد. برای نگهداری نمونه‌ها به مدت طولانی‌تر، سرم یا پلاسمای بیمار را در حجم‌های کم تقسیم و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری نمائید. بهتر است از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه‌ها اجتناب شود. برای اندازه‌گیری فریتین نمونه‌های منجمد شده، ابتدا نمونه را در حرارت اتاق ذوب و سپس با حرکت دست یکنواخت کنید. برای یکنواخت کردن نمونه‌ها از Vortex نباید استفاده شود. برای اندازه‌گیری دقیق نمونه‌هائی که غلظت فریتین آنها بیش از آخرین استاندارد است، ابتدا نمونه‌ها را با استاندارد صفر رقیق و دوباره اندازه‌گیری کنید. بدیهی است در محاسبه نتایج این نمونه‌ها، ضریب رقت منظور می‌شود.

VI. روش کار

قبل از شروع کار باید دمای تمامی محلولها به دمای اتاق برسد.

محلول شستشوی غلیظ به نسبت یک به بیست با آب مقطر یا دیونیزه رقیق شود . (یک حجم محلول شستشوی غلیظ به ازاء ۱۹ حجم آب). محلول شستشوی رقیق به مدت یک هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری است . در صورت مشاهده کریستال در محلول غلیظ شستشو ، ویال را به مدت چند دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید تا محلول یکنواخت گردد.

۱. ابتدا ۲۵ میکرولیتر از استانداردها، سرم کنترل‌ها و سرم بیماران را داخل حفره‌های مربوطه بریزید، و به آن ۲۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده اضافه کنید. سپس با تکان دادن پلیت، محتویات حفره‌ها را به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط کنید.

۲. پلیت را ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.

۳. حفره ها را ۴ مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشوئید.

۴. به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر کونژوگه ضد فریتین (HRP) اضافه کنید و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.

۵. حفره ها را ۴ مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشوئید.

۶. به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای TMB اضافه کنید.

۷. پلیت را ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در محلی تاریک قرار دهید.

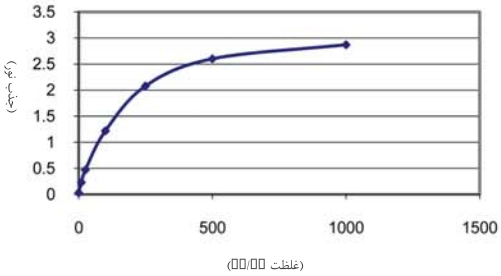
۸. ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده واکنش در هر حفره بریزید و ۱۰ ثانیه مخلوط کنید. میزان جذب نور حفره‌ها را حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) بخوانید.

VII. محاسبه نتایج

پس از تعیین میزان جذب نوری استانداردها و نمونه‌ها و ترسیم منحنی استاندارد، غلظت فریتین بیماران را می‌توان محاسبه کرد. در منحنی مذکور که با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (قابل برنامه‌ریزی) و یا به صورت دستی ترسیم می‌شود، محور Y شاخص میزان جذب نور استانداردهای فریتین در طول موج ۴۵۰ نانومتر و محور X شاخص غلظت استانداردهای فریتین برحسب ng/ml است. نتایجی که در جدول زیر آمده، فقط مثال هستند و نباید برای تفسیر نتایج از آنها استفاده شود.

غلظت فریتین (ng/ml)	جذب نور	نمونه
۰	۰/۰۳	استاندارد A
۱۰	۰/۲۳	استاندارد B
۲۵	۰/۴۷	استاندارد C
۱۰۰	۱/۲۲	استاندارد D
۲۵۰	۲/۰۸	استاندارد E
۵۰۰	۲/۶۰	استاندارد F
۱۰۰۰	۲/۸۷	استاندارد G
۱۵۷	۱/۸۱	سرم

برای ترسیم منحنی از غلظت‌های مندرج بر روی ویال استانداردها استفاده کنید.



VIII. مقادیر طبیعی

از آنجائی که در جوامع و مناطق جغرافیائی مختلف، مقادیر فریتین سرم متفاوت است، توصیه می‌شود که هر آزمایشگاه با در نظر گرفتن غلظت سرمی فریتین افراد سالم منطقه، دامنه طبیعی آن را تعیین و از آن برای تفسیر نتایج بیماران خود استفاده کند. جدول زیر نیز راهنمایی کلی است.[11]

غلظت فریتین (ng/ml)	سن
۲۰۰-۶۰۰	۱ ماه
۵۰-۲۰۰	۲-۵ ماه
۷-۱۴۰	۶ ماه تا ۱۵ سال
۲۰-۲۵۰	مردان
۱۰-۱۲۰	زنان

IX. ویژگی‌های اختصاصی تست

۱. حساسیت: به حداقل غلظت فریتین که اختلاف جذب نور آن نسبت به جذب نور استاندارد صفر، معنی‌دار باشد حساسیت کیت گفته می‌شود. این مقدار برای کیت EIA پادتن علم ۰/۵ ng/ml است.

۲. اثر هوک (Hook effect): در کیت EIA پادتن علم برای نمونه‌های رقیق نشده تا غلظت ۵۰۰μg/ml اثر هوک مشاهده نشده است.

۳. مقایسه با روش الکترو کمی لومینسانس: برای بررسی همبستگی آماری بین کیت EIA پادتن علم و روش ECL ، غلظت فریتین ۱۰۰۰ نمونه تصادفی با هر دو کیت اندازه‌گیری شد. مقایسه نتایج به دست آمده، ضریب همبستگی ۰/۹۷ را نشان می‌دهد.

۴. دقت: شاخص دقت کیت با مقایسه تکرار پذیری جواب‌ها به روش میان سنجی (Inter-assay) و درون‌سنجی (Intra-assay) تعیین شده است. برای این منظور ۴ نمونه سرم ده بار در یک دوره آزمایش (درون‌سنجی) و یکبار در ده دوره آزمایش متفاوت (میان‌سنجی) تعیین غلظت شده است. نتایج انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات (CV) در جدل زیر آمده است.

جدول شاخص دقت

درون‌سنجی			میان‌سنجی		
میانگین (ng/ml)	SD	٪CV	میانگین(ng/ml)	SD	٪CV
۲۳/۴	۳/۱۴	۱۳/۴۲	۲۱/۶۱	۱/۹۸	۹/۱۹
۱۰۴/۳۶	۸/۰۸	۷/۷۵	۱۰۵/۷۹	۹/۵	۸/۹۸
۲۴۰/۰۴	۸/۰۴	۳/۳۵	۲۴۰/۶۱	۷/۶۷	۳/۱۸
۴۰۶	۱۲/۴۶	۳/۰۶۹	۴۱۶/۹۵	۹/۸۲	۲/۳۶

۵. ریکاوری و رقت: ریکاوری به حالتی اطلاق می‌شود که با افزودن حجم معینی از یک محلول با غلظت بالا، به نمونه رقیق‌تر، افزایش غلظت حاصل شود. برای تعیین ریکاوری، محلولی با غلظت بالای فریتین به نمونه سرمی که غلظت پائینی از فریتین دارد، افزوده شده است. درصد ریکاوری طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$\frac{\text{غلظت اندازه‌گیری شده (ng/ml)}}{\text{غلظت پیش‌بینی شده (ng/ml)}} \times ۱۰۰$$

دامنه درصد ریکاوری به دست آمده از ۹۱/۷ تا ۱۱۴/۳ است.

جدول ریکاوری

درصدریکاوری	غلظت اندازه‌گیری شده (ng/ml)	غلظت پیش‌بینی شده (ng/ml)	غلظت افزوده شده (ng/ml)
-	۱۲/۳	-	-
۱۱۴/۳	۶۴	۵۶	۴۳/۷
۹۵/۶	۸۸/۳	۹۲/۴	۸۰/۱
۹۶/۳	۱۱۸/۶	۱۲۳/۲	۱۱۰/۹
۹۱/۷	۱۳۶/۹	۱۴۹/۲	۱۳۶/۹

برای بررسی خطی بودن رقتهای فریتین بر روی منحنی چندین نمونه سرمی غلیظ، پس از رقیق شدن متوالی با استاندارد صفر، اندازه‌گیری شده و نتایج یک نمونه برای مثال در جدول زیر آورده شده است. دامنه درصد ریکاوری به دست آمده از ۷۳/۱ تا ۱۰۰/۸ است.

جدول رقت

درصد ریکاوری	غلظت اندازه‌گیری شده (ng/ml)	غلظت پیش‌بینی شده (ng/ml)	رقت
-	۶۶۰/۸	-	-
۱۰۰/۸	۳۳۳/۲	۳۳۰/۴	۱:۲
۹۳/۴	۱۵۴/۳	۱۶۵/۲	۱:۴
۹۳	۷۶/۸	۸۲/۶	۱:۸
۷۳/۱	۳۰/۲	۴۱/۳	۱:۱۶

X. References

1. Mariani, G., Molea, N., Mazzuca, N., Frijia, M., Macchia, P. A. and Bianchi, R. Normal values for serum ferritin in infants and children using a new RIA system utilizing a solid-phase second antibody (Lisophase). J. Nuc. Med. And Allied Sc. 25:125, 1982.

2. Cook, J. D., Lipschitz, D. A., Miles, L. E. M. and Finch, C. A. Serum ferritin as a measure of iron stores in normal subjects. Amer. J. Clin. Nut. 27:681 (1974).

3. Addison, G. M., Beamish, M. R., Hales, C. N., Hodgkings, M., Jacobs, A. and Llewellin, P. An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. J. Clin. Path. 25:326, 1972.

4. Prieto, J., Barry, M., and Sherlock. S. Serum ferritin in patients with iron overload and with acute and chronic liver disease. Gastroenterology, 68:525, 1975.

5. Worwood, M., Summers, M., Miller, F., Jacobs, A. and Whittaker, J. A. Ferritin in blood cells from normal subjects and patients with leukemia. British J. Haem. 28:27, 1974.

6. Jacobs, A., Slater, A., Whittaker, J. A., Canellos, G., and Wiernik, P. H. Serum ferritin concentration in untreated Hodgkin's disease. British J. Cancer. 34:162, 1974.

7. Jacobs, A., Jones, B., Ricketts, C., Bulbrook, R. D. And Wang, D. Y. Serum ferritin concentration in early breast cancer. 34:286, 1976.

8. Macali, B., Gieffreflorio, M. A., Venuti, A., Giorgianni, G. and Saitta, F. P. The signifiace of tumor marker assay in the staging of breast cancer. Assessment of ferritin and HCG levels. J. Nuc. Med. And All. Sc. 25:65, 1981.

9. Beamish, M. R., Walker, R., Miller, F., Worwood, M., Jacobs, A. Williams, R. and Corrigall, A. Transferrin iron, Chelatable iron and ferritin in idiopathic haemochromatosis. British Journal of Haematology. 27:219, 1974.

10. Letsky, E. A., Miller, F., Worwood, M. and Flynn, D. M. Serum ferritin in children with thalassaemia regularly transfused. J. Clin. Path. 27:652, 1974.

11. Burtis C. A., Ashwood E. R., Fundamentals of clinical chemistry. 4th Edition: 789, 1999.

احتیاط!

با توجه به اینکه محلول‌های به‌کار رفته در این کیت‌ها حاوی مواد سمی مانند تیمروزال و مواد پروتئینی با منشا انسانی و حیوانی هستند، و اینکه با هیچ تستی نمی توان از عدم وجود ویروس‌هایی چون HIV, HBV, HCV در این محلول‌ها اطمینان کامل حاصل کرد، خواهشمند است هنگام کار احتیاط‌های لازم از جمله استفاده از دستکش، امتناع از خوردن و آشامیدن و سیگار کشیدن، خودداری از پیپت کردن با دهان و پرهیز از هرگونه تماس محلول با چشم و دست‌ها، رعایت شود.

Rev: Apr. 2021

تهران ۱۴۱۶۸، خیابان طالقانی غربی، خیابان شهید سرپرست (کیوان جنوبی)، پلاک ۲۶
تلفن ویژه : ۶۳۴۸۱ (۰۲۱)