راهنمای کیت

Super Ferritin

مقدمه:

Ferritin مجموعه ای از انباشت پروتئین - آپوفریتین (با وزن مولکولی 44500) شامل مقادیر متغیری از آهن در مرکز آن بعنوان کمپلکس Ferric Hydroxite Phosphate است. منشا فریتین سیستم رتیکلو آندوتلیال است.فریتین سرم شامل 25-20% آهن می باشد که معیار مناسبی از ذخیره آهن در افراد طبیعی و مبتلایان به فقر آهن است. 1 ng/ml یا 1µg/L از فریتین سرم معادل 8 mg ذخیره آهن (143 µMol) می باشد. عملکرد توام آهن با فریتین احتیاج به اکسیداسیون آهن 2 به آهن 3 دارد. اندازه گیری فریتین اندیکاتور خوبی از قابلیت ذخیره سازی آهن است ودر مراحل غیر پیچیده آنمی فقر آهن ،هموکروماتوز ایدیوپاتیک (با علت نا معلوم)،سیدروز ناشی از ترانسفوزیون کاربرد دارد.مولکول فریتین شامل 24 subunit پروتئینی که هر کدام وزن مولکولی 2000 دالتون دارند ،میباشد.بیشترین حضور فریتین در سلولهای کبد - طحال و مغز استخوان است. مقادیر کمتری در قلب - پانکراس وکلیه هاست.نقش اصلی فریتین سرم ناشناخته است ولی بهر حال ارتباط بین ذخیره آهن بدن با غلظت این پروتئین مسلم است.

معرفی آزمایش و کاربرد بالینی:

در آنمی فقر آهن ، هموکروماتوز سیدروز و یا شرایطی از بالا بودن سطح آهن و بعضی بیماری های مزمن،فریتین سرم شاخصی از ذخیره آهن است. همچنین همراه با سن میزان فریتین افزایش می یابد.در لوسمی حاد ، بیماری های التهابی ،بیماری های مشخص کبدی - هموکروماتوز - عفونت های مجاری ادراری مزمن ، بیماری های هپاتوسلولار مزمن وحاد مانند الکلیسم و التهاب کبد ، لوسمی حاد میلوبلاستیک و لنفوبلاستیک هوچکین - سرطان پستان می توانند موارد پائین بودن فریتین را بپوشانند. در فقر آهن فریتین کمتر از 10ng/ml می باشد.

محدوده طبیعی :

مقادیر نرمال Ferritin در سرم افراد طبیعي که توسط تست هاي مکرر به روش الایزا بدست آمده به شرح زیر می باشد ولي پیشنهاد مي گردد تا هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد:

سن	ng/ml یا µg/L
نوزاد	276-30
نوزاد هفته دوم تا سوم	628-90
نوزاد یک ماهه	399-144
نوزاد 2 تا 5 ماهه	430-37
6 ماهه تا 15 ساله	142-7
بالغین(مرد)	320-20
مردان 65-87	665-4
بالغین(زن)	120-10
زنان 65-87 ساله	651-13

اساس آزمایش :

اساس این کیت به روش ساندویچ الایزا می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادی منوکلونال بر علیه یک واحد آنتی ژنیکِ FERRITIN , Coat میشوند. نمونه بیماران با آنتی بادی Coat شده در چاهکها مجاور می شود، سپس آنتی بادی ثانویه متصل به آنزیم HRP به چاهکها اضافه می شود که باعث ایجاد یک کمپلکس ایمنی می شود که نشانگر غلظت FERRITIN در نمونه ها می باشد. در ادامه پس از شستشو ، محلول رنگزا که حاوی H2O2 و کروموژن است به داخل چاهکها ریخته میشود و تولید رنگ آبی می کند که رنگ آبی تولید شده متناسب با کمپلکس ایمنی ایجاد شده در چاهکها می باشد. با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل میشود که بهترین جذب نوری را در طول موج 450 نانومتر دارد.

جمع آوري و أماده سازي نمونه :

سرم یا پلاسما را مي توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود . نمونه را مي توان به مدت 7 روز در دماي 2 تا 8 درجه سانتي گراد ویا براي مدت زمان طولاني تر در دماي 20- درجه سانتیگراد نگهداري کرد.

(درضمن باید از Freeze – Thaw نمودن پرهیز شود) از مخلوط کردن خیلی سریع خودداری کنید چون ممکن است سبب دناتوره شدن فریتین شود. همچنین نمونه هائی که همولیز و لیپمیک هستند ، نباید مورد استفاده قرار گیرند.

واکنش های تداخلی:

اتانول - نمک های آهن و قرص ضد بارداری سبب افزایش کاذب و اریتروپوئتین سبب کاهش کاذب فریتین می شود.

محتویات کیت :

1- یک عدد پلیت حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد Ferritin (Anti -Ferritin coated Plate) دارای 96 چاهک

2- سری استاندارد (Standard Set) : 7 ویال استاندارد دارای غلظت های ng/ml صفر، 10 ،50، 100،200،500،1000 که هر ویال محتوی 1 میلی لیتر می باشد.

3- سرم کنترل (Control Serum) : دو ویال حاوی 1 میلی لیتر سرم کنترل با غلظت های مشخص نوشته شده روی برچسب ویال.
4- محلول رقیق کننده نمونه ها (Sample Diluent) : یک ویال حاوی 1 میلی لیتر برای رقیق کردن نمونه هائی که غلظت بالاتری از بالاترین استاندارد کیت را دارا می باشند.
5- محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی 12 میلی لیتر محلول حاوی Ferritin کنژوکه شده با HRP .
6- محلول اسی بافر (Assay Buffer) : یک ویال حاوی 12 میلی لیتر محلول.
7- محلول شستشو (Washing Solution) : یک ویال حاوی 40 میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (25 X) که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف مقدار لازم از محلول شستشوی غلیظ را به نسبت 1/25 با آب مقطر رقیق کنید.
8- محلول رنگزا (Chromogen Substrate) : یک ویال محتوی 12 میلی لیتر و آماده برای مصرف.
9- محلول متوقف کننده (Stop Solution) :یک ویال محتوی 12 میلی لیتر.
10- بر چسب مخصوص پلیت (Card Board Sealer)

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

1- دستگاه خوانش الایزا (Eliza Reader) دارای فیلتر 450 نانومتر ودر صورت امکان 630 به عنوان فیلتر رفرانس.
2- سمپلر های 50 و 100 میکرولیتر دقیق
3- آب مقطر

نكات قابل ذكر براي مصرف كنندگان :

1- محتويات اين كيت براي مصرف در همين كيت مي باشد .
2- از مخلوط كردن محتويات كيتها باشماره ساختهاي مختلف جدا" خودداري نمائيد .
3- كليه مواد موجود در كيت كه منشاء سرمي دارند از نظر وجود HIV,HCV, HBs AG كنترل گرديده اند و فاقد اين عوامل مي باشند . جهت احتياط بهتراست هر كاربري كه با كيت كار مي كند از تماس مستقيم با مواد بپرهيزد .

توضيحات عمومي:

4- قبل از شروع مراحل آزمايش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق رسانده و به خوبي تكان دهيد تا كاملا" يكنواخت شوند.
5- بهتراست به محض شروع آزمايش كليه مراحل بدون توقف انجام پذيرند .
6- ازنوك سمپلر يك بار مصرف براي هر نمونه استفاده كنيد .
7- پس از افزودن محلول متوقف كننده ، جذب نوري چاهكها حداكثر تا نيم ساعت قابل قرائت مي باشد .
8- براي كسب نتايج مطلوب بايد شستشوي چاهكها بصورت كامل صورت گرفته وآخرين قطرات پس از شستشو از چاهكها تخليه شوند .
9- از مهمترين فاكتورها در حصول نتيجه مطلوب ، زمان انكو باسيون مناسب مي باشد ، بنابراين پيشنهاد مي گردد قبل از شروع آزمايش تمام مواد و محلولهاي مورد نيازرا آماده نموده و درب محلولهاي مورد نياز را باز كنيد ، اين عمل با كاهش فاصله زماني بين مراحل سمپلينگ باعث نتايج دقيقتري ميشود.
10- بهتر است كه حجم انجام تست محدود باشد وزمان ريختن نمونه ها پيش از5دقيقه به طول نيانجامد .

مراحل انجام آزمايش :

1- تعداد چاهكهاي مورد نظر را انتخاب نموده و باقي چاهكها را به همراه نمگير درون كيسه مخصوص نگهداري پليت قرار داده و درب آن را ببنديد .
2- 50 ميكروليتر از هر استاندارد ، سرم كنترل و نمونه را به داخل هر چاهك بريزيد ، پيشنهاد مي گردد كه از استانداردها و نمونه ها به صورت داپليكيت استفاده شود بدين معني كه هر استاندارد و نمونه را در دوچاهك بريزيد و در انتها از ميانگين جذب نوري آنها براي محاسبه نتايج استفاده كنيد .
3- 100 ميكروليتر از Assay Buffer را به هر چاهك اضافه نموده و پليت را به آرامي به مدت 15 ثانيه تكان دهيد تا محتويات آن بخوبي مخلوط شوند.
4- درب چاهكها را با برچسب مخصوص پليت پوشانده و چاهكها را به مدت 30 دقيقه در درجه حرارت اتاق (22-28 درجه سانتيگراد) انكوبه نمائيد .
5- محتويات چاهكها را خالي كرده و چاهكها را 5 بار با محلول شستشوي آماده مصرف بشوئيد (براي شستشو مي توان از سمپلر 8 كاناله استفاده نمود ولي بايد مواظب بود كه محلول شستشو از يك چاهك به چاهك ديگر وارد نشود زيرا مي تواند موجب ايجاد خطا در نتيجه آزمايش گردد). در هر دفعه شستشو حدود 300 ميكروليتر محلول شستشو در هر چاهك ريخته و سپس چاهك ها را درحالت وارونه و با ضربات ملايم بر روي يك پارچه يا كاغذ نمگير بكوبيد تا قطرات اضافي محلول شستشو خارج شوند.
6- 100 ميكروليتر محلول آنزيم كونزوگه (Enzyme Conjugate) به هرچاهك اضافه نمائيد و چاهكها را به مدت 30 دقيقه در درجه حرارت اتاق انكوبه نمائيد .
7- محتويات چاهكها را خالي كرده و چاهكها را 5 بار با محلول شستشوي آماده مصرف بشوئيد.
8- 100 ميكروليتر محلول رنگزا (Chromogen – Substrate) به هرچاهك اضافه نمائيد و چاهكها را به مدت 15 دقيقه در درجه حرارت اتاق و درتاريكي انكوبه نمائيد .
9- با اضافه كردن 100 ميكروليتر محلول متوقف كننده (Stop Solution) به هرچاهك ادامه واكنشهاي آنزيمي را متوقف نمائيد . براي سنجش جذب نوري هرچاهك از دستگاه الايزا ريدر با فيلتر 450 nm استفاده نمائيد .(توصيه مي شود از فيلتر 630 nm به عنوان فيلتر رفرانس استفاده گردد.)

شرايط نگهداري فرآورده تشخيصي:

1- دماي نگهداري كيت بين '2-8 C مي باشد و بهتراست كه در '4C نگهداري شود .

2- با توجه به انجام تست هاي accelerate , Full Term اين كيت درصورت رعايت موارد نگهداري صحيح تا 12 ماه پايدار مي باشد ودر اين مدت كيت حاضر بالاي 90 درصد كارايي اوليه را داراست. با توجه به آزمايشات انجام شده در صورت باز نمودن كيت يک ماه پايدار می باشد .

3- چاهكها را در كيسه مخصوص پليت همراه با نمگير نگهداري نمائيد .

4- **توجه :** درصورت بازشدن درب كيت و محلول ها تازماني كه آلودگي ميكروبي و قارچي رخ ندهد كيت پايدار خواهند بود.

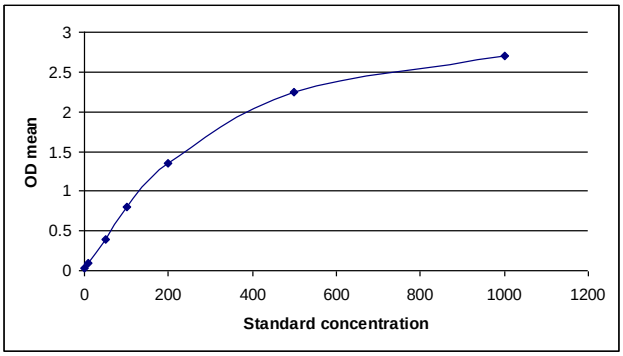
محاسبه نتايج :

1- جذب نوری استاندارد ها و نمونه ها را به کمک دستگاه Eliza Reader در طول موج nm450 و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس nm630 بخوانید.

2- با استفاده از میانگین جذب نوری استاندارد ها 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 ،در ادامه نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمائید تا منحنی بدست آید.

3- میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن را پیدا کنید ، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمائید بطوریکه این خط کاملا بر محور عمودی عمود باشد و در ادامه 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.

	استانداردها (ng/ml)	جذب نوری
St 1	0	0.03
St 2	10	0.10
St 3	50	0.41
St 4	100	0.82
St 5	200	1.38
St 6	500	2.23
St 7	1000	2.75



توجه : جذب های نوری و منحنی مربوط فقط به عنوان نمونه می باشند و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

شاخصهاي اجرائي:

1- حداقل مقدار قابل اندازه گيري :

براساس جذب نوري استاندارد صفر و سه برابر انحراف معيار (SD)حداقل غلظت FERRITIN قابل تشخيص در اين كيت 1 ng/ml مي باشد .

2- دقت آزمايش :

آزمايشهاي اينترا- اسي (همخواني غلظت مشخص از يك نمونه در يك سري آزمايش) و اينتر- اسي (همخواني غلظت مشخص ازيك نمونه در سري آزمايشهاي مختلف) بااستفاده از استانداردهائی با غلظتهاي مختلف FERRITIN انجام گرديد كه در جداول 1و2 آمده است .

جدول شماره 1 (اينترا- اسي)

نمونه	تعداد دفعات تكرار	ميانگين ng/ml	SD ng/ml	CV%
1	12	10	0/098	4/5
2	12	100	0/972	3/69

جدول شماره 2 (اينتر- اسي)

نمونه	تعداد دفعات تكرار	ميانگين ng/ml	SD ng/ml	CV%
1	5	10	0/090	7/49
2	5	100	0/893	5/6
3	5	500	2/13	2/68
4	5	1000	2/72	2/6

هرسري آزمايش بصورت Duplicate انجام شده است .

3- خطي بودن آزمايش :

به كمك استاندارد صفر رقتهاي متوالي 4 نمونه سرم با غلظت مشخص از FERRITIN تهيه گرديد و نتايج بر اساس ضريب رقت محاسبه شد كه درجدول زير نتايج آن آورده شده است .

جدول خطي بودن :

نمونه	مقدار FERRITIN موجود در سرم رقيق نشده (ng/ml)	ريكاوري (%)			
		رقت 25%	رقت 50%	رقت 75%	100%
1	10	102	98	100	96
2	100	95	92	96	101
3	500	93	97/5	98/3	91

4- ريكاوري آزمايش :

مقادير معلومي از FERRITIN به 4 سرم با غلظتهاي مشخص FERRITIN افزوده شد و ريكاوري آنها محاسبه گرديد كه نتايج آن در جدول زير آمده است .

جدول ريكاوري :

نمونه	مقدار FERRITIN موجود درسرم (ng/ml)	مقدار افزوده شده FERRITIN (ng/ml)	مقدار مورد انتظار (ng/ml)	مقدار بدست آمده (ng/ml)	ريكاوري (%)
1	8	10	9	8/5	94
1	8	100	54	50	92
1	8	500	254	241	94
2	38	10	24	22	91
2	38	100	69	64	92
2	38	500	269	239	88
3	162	10	172	173	100
3	162	100	262	250	95
3	162	500	662	641	96
4	410	10	420	402	95
4	410	100	510	488	95
4	410	500	910	860	94

5- اثر هوك (Hook Effect)

آزمايش FERRITIN جهت سرمهايي با غلظت بسيار بالا از اين آناليت (250µg/ml) صورت گرفت كه پديده هوك مشاهده نشد

References.

1. Cook J.D. , Lipschitz D.A., Miles L.E. M. and Finch CA. Serum Ferritin as a measure of iron store in normal subject. Am. J. Clin. Nutr. 1974; 27:681.
2. Beard. L. Iron biologu in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. J. Nutr. 2001; 131: 5658-5805.
3. Dawson, DW. Et al. The accuracy and chemical 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.

Adress:
No:1161 , Bid Avenue , Payetakht , Industrial zone , Tehran , Iran
Tel : +98 21 66 56 91 84 - 66 59 37 41 Fax : +98 21 66 56 14 28
Email : info@biokarpira.com
www.biokarpira.com

043 ISO 9001-2008 13485