

کیت الایزا برای تعیین غلظت فریتین انسانی

Human Ferritin ELISA Kit

(دو روش)

مقدمه :

فریتین پروتئین ذخیره کننده آهن در بافت های بدن است که با غلظت بالا در کبد، طحال و مغز استخوان وجود دارد. مقدار کمی فریتین در سرم وجود دارد که رابطه مستقیمی با ذخایر بافتی فریتین دارد. لذا از اندازه گیری فریتین سرم برای تعیین ذخایر آهن بدن استفاده می شود. اندازه گیری فریتین سرم در تشخیص کمبود و زیادی آهن بدن اهمیت دارد. از آن برای تشخیص کم خونی فقر آهن از سایر کم خونی با علل مختلف استفاده می شود. عملاً تمام بیماران با آهن و فریتین سرم پایین مبتلا به کم خونی فقر آهن هستند.

اساس روش اندازه گیری :

کیت الایزا فریتین موجود، براساس سنجش ایمنولوژیکی آنزیمی ساندویچی تهیه شده است. فریتین موجود در نمونه ها بعنوان آنتی ژن به دو آنتی بادی زوج اختصاصی خود متصل می گردد. هر دو آنتی بادی از نوع منوکلونال موشی هستند که یکی بر روی فاز جامد (چاهک ها) پوشش داده شده است و دیگری به آنزیم HRP متصل شده است. نمونه مورد آزمایش که دارای فریتین است، در معرض دو آنتی بادی قرار می گیرد. پس از زمان انکوباسیون، چاهک ها تخلیه شده و شستشو داده می شوند تا آنتی بادی متصل به آنزیم HRP اضافی خارج گردد. سپس به هر چاهک سوبسترای آنزیم اضافه می شود که فعالیت آنزیم بطور مستقیم با غلظت فریتین در نمونه ها متناسب است. استانداردهای فریتین با غلظت مشخص، همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که براساس منحنی استاندارد جذب نور در مقابل غلظت فریتین، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید.

معرف ها :

۱- میکروپلیت پوشش داده شده: شامل ۹۶ چاهک جداشدنی که با آنتی بادی منوکلونال موشی ضد فریتین پوشش داده شده اند.

۲- کونژوگه آنزیمی (HRP-Anti-Ferritin) : دو ویال ۱۲ میلی لیتری آماده مصرف.

۳- استانداردها : ۷ ویال نیم میلی لیتری از استاندارد فریتین با غلظت های ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر (ng/ml) که در سرم نرمال انسانی تهیه شده و از تیومرسال بعنوان نگهدارنده استفاده شده است.

۴- سرم کنترل: یک ویال نیم میلی لیتری آماده مصرف.

۵- محلول شستشو دهنده غلیظ (20X) : یک ویال ۲۵ میلی لیتری محلول شستشو که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف لازم است این محلول به نسبت ۱/۲۰ با آب دیونیزه رقیق شود.

۶- محلول رنگ ز: یک ویال ۱۲ میلی لیتری محلول آماده مصرف

۷- محلول متوقف کننده واکنش: یک ویال ۱۲ میلی لیتری اسیدسولفوریک یک نرمال.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

۱- سمپلر ۲۰۰ - ۱۰۰ - ۲۰ μl

۲- آب دیونیزه

۳- دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.

۴- کاغذ جاذب رطوبت.

۵- انکوباتور 37 ± 1 درجه سانتی گراد.

نکات قابل توجه برای مصرف کنندگان :

۱- از تماس محلول متوقف کننده واکنش (1N H₂SO₄) با پوست خودداری کنید. در صورت تماس، با آب فراوان آنرا بشوئید.

۲- از استفاده از مواد پس از تاریخ انقضاء خودداری کنید و از مخلوط کردن یا استفاده از کیت ها با شماره بچ مختلف پرهیز نمایید.

۳- درب ظروف را پس از استفاده ببندید و از تعویض درب ها جدا خودداری کنید.

۴- محلول های محتوی مواد افزودنی یا نگهدارنده مثل سدیم آزاید نباید در واکنش آنزیمی وارد شوند.

۵- کیت های باز نشده پس از تحویل باید در دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد (یخچال) نگه داری شوند. میکروپلیت باید در کیسه در بسته به همراه ماده جاذب رطوبت نگه داری شود. کیت باید تا تاریخ انقضاء استفاده شود (یکسال از زمان تولید). برای اطلاع از تاریخ انقضاء به برجسب کیت مراجعه شود.

۶- کیت های باز شده حداقل به مدت ۴ ماه پایدار خواهد ماند، اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شود.

۷- توصیه می شود که بیشتر از ۳۲ چاهک در هر مرحله کاری استفاده نشود. اگر پی پت به صورت دستی انجام می گیرد، پی پت کردن همه استانداردها، نمونه ها، کنترل ها باید در ۵ دقیقه تمام شود. برای پی پت کردن کل پلیت ۹۶ تستی باید از پی پت اتوماتیک استفاده شود.

۸- فرایند شستشو خیلی مهم است. شستشوی ناکافی باعث کاهش دقت و افزایش کاذب جذب می شود.

تهیه و جمع آوری نمونه :

۱- آزمایش را باید بر روی نمونه های سرمی انجام داد. نمونه های شدیداً همولیزه و دارای چربی باید حذف شوند.

۲- نمونه ها را می توان برای دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد و برای زمان های طولانی تر (تا سی روز) در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمود.

۳- از انجماد و ذوب مکرر نمونه ها باید خودداری کرد.

۴- در مواردی که مقدار فریتین نمونه بیش از 1000 ng/ml باشد، نمونه را با استاندارد صفر رقیق نموده و سپس آزمایش را تکرار نمایید.

آماده سازی معرف ها :

۱- کلیه معرف ها را به دمای اتاق برسانید. قبل از استفاده آنها را به آرامی کاملاً سر و ته نمایید.

۲- برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب دیونیزه رقیق نمائید. محلول شستشو در دمای اتاق به مدت ۲ ماه پایدار است.

روش انجام آزمایش :

روش ۱

۱- تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، سرم کنترل و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده آنگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.

۲- ۲۰ میکرولیتر از استانداردها، سرم کنترل و نمونه ها به چاهک مورد نظر اضافه کنید.

۳- ۲۰۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی به تمام چاهک ها اضافه کنید.

۴- پلیت را بمدت ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها خوب مخلوط شوند (در این مرحله مخلوط کردن کامل بسیار مهم است). سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پوشانده و پلیت را بمدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه کنید.

۵- محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را ۵ بار با ۳۰۰ میکرولیتر بافر شستشوی آماده مصرف بشوئید. برای شستشوی چاهک ها، ابتدا ۳۰۰ میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک ها را وارونه کرده و همراه با تکان دادن خالی کنید و در انتهای شستشو، با ضربات ملایم بر روی کاغذ جاذب تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.

۶- ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را بمدت ۲۰ دقیقه بدون تکان دادن، در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

۷- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همه چاهک ها اضافه کنید. مدت ۱۵ ثانیه مخلوط شود. خیلی مهم است تا مطمئن شوید رنگ آبی کاملاً به رنگ زرد تغییر پیدا کرده است. سپس جذب نور هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید). سنجش جذب نوری باید حداکثر تا ۳۰ دقیقه پس از اتمام آزمایش انجام شود.

روش ۲ (این روش برای جلوگیری از پدیده هوک ارائه شده است)

۱- تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، سرم کنترل و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده آنگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.

۲- ۵۰ میکرولیتر از استانداردها، سرم کنترل و نمونه ها به چاهک مورد نظر اضافه کنید. درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پوشانده و پلیت را بمدت نیم ساعت در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه کنید.

۳- محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را ۳ بار با ۳۰۰ میکرولیتر بافر شستشوی آماده مصرف بشوئید.

۴- ۵۰ میکرولیتر کونژوگه آنزیمی به تمام چاهک ها اضافه کنید. درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پوشانده و پلیت را بمدت نیم ساعت در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه کنید.

۳- محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را ۵ بار با ۳۰۰ میکرولیتر بافر شستشوی آماده مصرف بشوئید. برای شستشوی چاهک ها، ابتدا ۳۰۰

میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک ها را وارونه کرده و همراه با تکان دادن خالی کنید و در انتهای شستشو، با ضربات ملایم بر روی کاغذ جاذب تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.

۶- ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را بمدت ۲۰ دقیقه بدون تکان دادن، در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

۷- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همه چاهک ها اضافه کنید. مدت ۱۵ ثانیه مخلوط شود. خیلی مهم است تا مطمئن شوید رنگ آبی کاملاً به رنگ زرد تغییر پیدا کرده است. سپس جذب نور هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید). سنجش جذب نوری باید حداکثر تا ۳۰ دقیقه پس از اتمام آزمایش انجام شود.

محاسبه نتایج

۱- با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد رسم کنید.

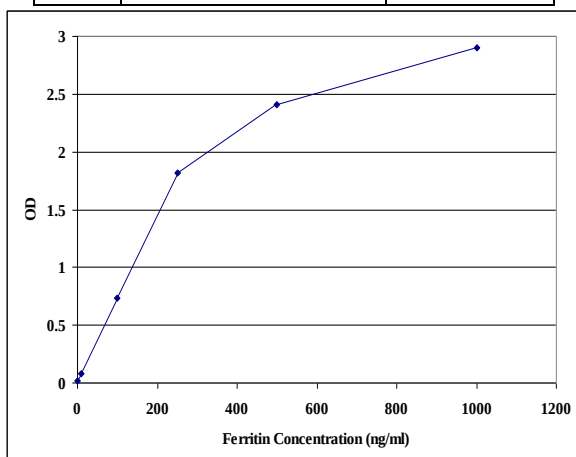
۲- میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

۳- با استفاده از کامپیوتر این محاسبات ساده خواهد شد.

راهنمای محاسبه

مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل تنها بعنوان راهنمایی آورده شده است و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید بدست آورد.

No.	Ferritin Con. (ng/ml)	OD
1	0	0.020
2	10	0.085
3	25	0.2
4	100	0.73
5	250	1.82
6	500	2.41
7	1000	2.90



هر آزمایشگاه باید دامنه طبیعی را برای خود به دست آورد. این مقادیر فقط برای راهنمایی داده شده است.

مردان بالغ	۲۰-۲۵۰ ng/ml
زنان بالغ	۱۰-۱۲۰ ng/ml
کودکان ۶ ماه الی ۱۵ سال	۷-۱۴۰ ng/ml
نوزاد ۵-۲ ماهه	۵۰-۲۰۰ ng/ml
نوزاد یک ماهه	۲۰۰-۶۰۰ ng/ml
نوزادان بدو تولد	۲۵-۲۰۰ ng/ml

خصوصیات کیت:

۱- حساسیت آنالیتیکال (حد تشخیص): برای تعیین حد تشخیص ۲۰ مرتبه استاندارد صفر آزمایش شد. حد تشخیص از ۲ انحراف معیار (SD) بالاتر از میانگین جذب در غلظت صفر بدست آمد. حد تشخیص برای این کیت ۲ ng/ml بدست آمد.

۲- ویژگی: واکنش متقاطع آنتی بادی های مونوکلونال مورد استفاده در این آزمایش برای آلبومین سرم انسان، آلفا فیتوپروتئین و ترانسفرین انسانی به ترتیب ۰.۰۸، ۰.۳۱ و ۰.۰۶ درصد بدست آمد. این مطالعه با اضافه کردن این پروتئین ها به استاندارد صفر به صورت دوبلیکیت و در دو سری کاری تعیین گردید.

۳- دقت: برای محاسبه میزان دقت در یک روز و روزهای مختلف، آزمایش بر روی ۶ نمونه سرم ۱۵ بار تکرار شد که ضریب تغییرات به شرح ذیل است.

ضریب تغییرات در روز

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	15	8.27	0.72	8.77
2	15	18.4	1.00	5.46
3	15	39.82	2.32	5.82
4	15	77.66	4.62	5.95
5	15	382.67	14.35	3.75
6	15	586.06	24.43	4.17

ضریب تغییرات در روزهای مختلف

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	15	8.5	1.09	12.86
2	15	18.81	1.40	7.44
3	15	39.22	3.56	9.08
4	15	78.78	5.34	6.77
5	15	392	24.06	6.13
6	15	589.46	28.56	4.84

۴- خطی بودن: سه نمونه مختلف سرمی با استاندارد صفر به نسبت های ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۸ رقیق شدند. سپس غلظت فریتین در آنها با استفاده از کیت محاسبه شد که نتایج ذیل بدست آمد.

نمونه سرمی	غلظت اولیه (ng/ml)	درصد بازیابی		
		1:2	1:4	1:8
1	150.7	105	108	107
2	325.4	98	102	104
3	821.2	99	101	106

۵- اثر هوک: در روش ۱، اثر هوک تا غلظت ۵۰۰۰ ng/ml ظاهر نمی شود. در روش ۲، اثر هوک تا غلظت ۹۰۰۰۰ ng/ml ظاهر نمی شود.

محدودیت ها:

نتایج قابل قبول و تکرارپذیر زمانی حاصل خواهد شد که روش کار با درک کامل دستورالعمل موجود در کیت و مهارت های عملی خوب انجام گیرد. آنتی بادی های هتروفل موجود در سرم انسان می توانند با ایمونوگلوبولین موجود در معرف واکنش داده و در آزمایش مداخله نمایند. بیمارانی که به طور مداوم در معرض محصولات سرمی حیوانی هستند، مستعد این نوع تداخل می باشند و مقادیر غیرطبیعی ممکن است مشاهده شود. در این موارد، برای تشخیص اطلاعات بیشتری لازم است.

کنترل کیفی:

عملکرد آزمایشگاهی خوب مستلزم این است که در هر سری کاری همراه با هر منحنی استاندارد نمونه های کنترل کیفی نیز برای تایید شاخص های اجرایی سنجش، آنالیز شوند. برای تضمین شاخص های اجرایی صحیح و برای تعیین مقادیر میانگین و دامنه های قابل قبول تعداد نمونه های کنترلی که آنالیز می شوند باید از لحاظ آماری معنی دار باشند.