

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 IRMA Ferritin موجود، براساس سنجش ایمونولوژیکی رادیواکتیو 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 (لوله ها) پوشش داده شده است و دیگری به يد- ۱۲۵ متصل شده است. نمونه مورد آزمایش که دارای فریتین است، در معرض دو آنتی بادی قرار می گیرد. پس از زمان انکوباسیون، لوله ها تخلیه شده و شستشو داده می شوند تا آنتی بادی متصل به يد- ۱۲۵ اضافی خارج گردد. سپس اکتیویته موجود در هر لوله توسط شمارنده گاما اندازه گیری می شود که این اکتیویته 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 مقدار شمارش مقابل غلظت فریتین، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید.

معرف ها

- ۱- لوله های پوشش داده شده : شامل ۱۰۰ لوله که با آنتی بادی منوکلونال موشی ضد فریتین پوشش داده شده اند.
- ۲- ردیاب (آنتی بادی علیه فریتین نشاندار شده با يد- ۱۲۵): یک ویال ۵۶ 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 ۵۰ میلی لیتری محلول شستشو که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف لازم است این محلول به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شود.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست

- ۱- سمپلر ۲۰ و ۵۰۰ میکرولیتری دقیق

- ۲- آب دیونیزه
- ۳- دستگاه شمارنده گاما
- ۴- کاغذ جاذب رطوبت
- ۵- لوله های آزمایش معمولی برای شمارش تام

نکات قابل توجه برای مصرف کنندگان

- ۱- در این کیت از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر HbsAg و HIV منفی بوده اند.
- 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- از لباس و دستکش یکبار مصرف هنگام کار با مواد رادیواکتیو استفاده کنید.
- ۵- لوازم آزمایشگاهی آلوده به مواد رادیواکتیو جداگانه و با روش های ایمن (براساس دستورالعمل های حفاظت در برابر اشعه) شستشو و یا پسماند نماید.

تهیه و جمع آوری نمونه

- ۱- آزمایش را باید بر روی نمونه های سرمی و پلاسمایی انجام داد. نمونه های ششیدا همولیزه و دارای چربی باطل حذف شوند.
- ۲- نمونه ها را می توان برای دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد و برای زمان های طولانی تر 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 ۱۰۰۰ ng/ml باشد، نمونه را با استاندارد صفر رقیق نموده و سپس آزمایش را تکرار نمایید.
- ۵- معرف ها باید مستقیماً به لوله ریخته شوند.
- ۶- از تماس نوک سمپلر با ته لوله خودداری کنید.

آماده سازی معرف ها

- ۱- کلیه معرف ها را به دمای اتاق برسانید. قبل از استفاده آنها را به آرامی سر و ته نمایید.
- ۲- برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمایید.

روش انجام آزمایش

- ۱- تعداد لوله های پوشش شده برای استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید. برای شمارش تام از لوله های معمولی استفاده کنید.
- ۲- ۲۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر لوله بریزید.
- ۳- ۵۰۰ میکرولیتر از ردیاب را به تمام لوله ها اضافه کنید.

خصوصیات کیت

۱- حساسیت

با رقیق سازی متوالی استاندارد ۱۰ با سرم صفر، حساسیت این کیت برای تعیین مقدار فریتین برابر 5 ng/ml بدست آمد.

۲- دقت

برای محاسبه میزان دقت در یک روز و روزهای مختلف، آزمایش بر روی ۳ نمونه سرم ۲۰ 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	20	85.6	6.08	7.1
2	20	168.4	10.4	6.2
3	20	547.9	24.7	4.5

ضریب تغییرات در روزهای مختلف

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (CV)
1	10	111.3	9.3	8.4
2	10	623.4	39.9	6.4
3	10	871.6	47.1	5.4

۳- ویژگی

واکنش متقاطع آنتی بادی های مونوکلونال مورد استفاده در این آزمایش برای آلبومین سرم انسان، آلفا فیتوپروتئین و ترانسفرین انسانی به ترتیب 0.08، 0.31 و 0.06 درصد بدست آمد. این مطالعه با اضافه کردن این پروتئین ها به استاندارد صفر به صورت دوتایی و در دو سری کاری تعیین گردید.

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	157	106	107	109
2	378	104	103	105
3	678	102	103	104

۵- اثر هوک

در این کیت، پدیده اثر هوک تا غلظت 20000 ng/ml دیده نشد.

۴- لوله ها بمدت ۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات آنها خوب مخلوط شوند. سپس لوله ها را بمدت یک ساعت در همزن گردان مخصوص شرکت پادتن گستر ایثار و یا شیکر افقی (با سرعت 280 rpm) در درجه حرارت اتاق (۱۸ تا ۲۵ درجه سانتیگراد) انکوبه کنید.

۵- محتویات لوله ها را از طریق مکش یا وارونه کردن تخلیه نمائید (بجز لوله های شمارش تام). سپس لوله ها را دو بار و هر بار با دو میلی لیتر محلول شستشوی آماده مصرف شستشو دهید. برای اطمینان از تخلیه کامل، با وارونه نگهداشتن لوله ها برروی کاغذ جاذب و با ضربت ملایم برروی لوله تمامی مایع موجود در لوله ها را تخلیه کنید.

۶- با استفاده از شمارنده گاما، اکتیویته موجود در لوله ها را بمدت یک دقیقه شمارش کنید.

محاسبه نتایج

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

۲- میانگین شمارش 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.

راهنمای محاسبه

مقادیر شمارش 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.

ردیف	مقدار استاندارد (ng/ml)	شمارش (n=3)	B/T(%)
0	شمارش تام	224711	----
1	0	247	0.11
2	10	5393	2.4
3	25	11245	5.3
4	100	41347	18.4
5	250	75952	33.8
6	500	104940	46.7
7	1000	135051	60.1

مقادیر طبیعی

بدلیل اختلافات سنی، نژادی و رژیم تغذیه، نمی توان برای تمام جمعیت ها محدوده مرجع تعیین کرد. بنابراین هر آزمایشگاه باید محدوده مرجع خود را گزارش نماید. مقادیر طبیعی در سرم افراد نرمال که توسط آزمایشات مکرر به روش IRMA بدست آمده است به قرار زیر می باشد:

مردان بالغ	$20 - 270 \text{ ng/ml}$
زنان بالغ	$10 - 160 \text{ ng/ml}$
کودکان ۶ ماه الی ۱۵ سال	$7 - 140 \text{ ng/ml}$
نوزاد ۵-۱ ماهه	$50 - 200 \text{ ng/ml}$
نوزادان بدو تولد	$25 - 200 \text{ ng/ml}$