

کیت اندازه گیری Ferritin در سرم انسان

Ferritin ELISA Kit

96 Tests: Cat. No: 0824-96

192 Tests: Cat. No: 7624-192

Rev: B4 (1404/09/08)

مقدمه:

فریتین انسان، با جرم مولکولی تقریبی معادل ۴۷۰ کیلو دالتون شامل یک بخش پروتئینی به نام آپوفریتین با ۲۴ زیر واحد است که حدود ۴۵۰۰ اتم آهن را در خود ذخیره می کند. اندازه گیری فریتین در سرم معمولاً برای تشخیص زود هنگام آنمی ناشی از کمبود آهن، در بیماران به ظاهر سالم، انجام می شود. همچنین، این آزمایش در بررسی وضعیت آهن زنان باردار، اهداکنندگان خون، موارد آنمی مستقل از آهن نظیر التهاب و بیماری های مزمن کبد و بیماران دیالیزی اهمیت دارد. در بیماران دچار هپاتیت ویروسی و آسیب توکسیک کبد به دلیل رها شدن فریتین از سلول های آسیب دیده، سطح فریتین سرم افزایش می یابد. حیطه کاربرد این کیت اندازه گیری کمی سطح فریتین در نمونه سرم انسان به روش الیزا است.

اصول آزمایش:

این آزمایش براساس الیزای ساندویچ ترتیبی طراحی شده است. با اضافه شدن آنتی بادی بیوتینیل و سرم حاوی آنتی ژن به چاهک، بی حرکت سازی کمپلکس های ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهک ها و آنتی بادی بیوتینیل ضد فریتین صورت می گیرد. پس از شستشوی چاهک ها، آنتی بادی متصل به آنزیم HRP اضافه شده و کمپلکس های ساندویچ تشکیل می شوند. پس از به تعادل رسیدن واکنش و شستشوی مجدد چاهک ها، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی تولید می شود که بیشترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد. مقدار رنگ ایجاد شده و در نتیجه شدت جذب نوری با غلظت فریتین سرم، ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت فریتین سرم به کمک منحنی استاندارد محاسبه می گردد.

محتویات کیت:

کیت ۱۹۲ تستی	کیت ۹۶ تستی	محتویات کیت
دو عدد	یک عدد	میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده
یک سری ویال با غلظت های مختلف	یک سری ویال با غلظت های مختلف	کالیبراتورها (Ferritin Cal A-F): شش ویال با غلظت های ۰.۱۰، ۰.۵۰، ۱.۵۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ ng/mL
دو ویال ۱۱ میلی لیتری حاوی آنتی بادی ضد فریتین متصل به آنزیم HRP	یک ویال ۱۱ میلی لیتری حاوی آنتی بادی ضد فریتین متصل به آنزیم HRP	محلول کونژوگه آنزیمی (Ferritin Enzyme Conjugate)
یک ویال ۱۱ میلی لیتری حاوی آنتی بادی بیوتینیل ضد فریتین	یک ویال ۱۱ میلی لیتری حاوی آنتی بادی بیوتینیل ضد فریتین	محلول کونژوگه بیوتینی (Ferritin Biotin Conjugate)
یک ویال ۲۰ میلی لیتری	یک ویال ۲۰ میلی لیتری	محلول شستشو (Wash Solution-50X)
دو ویال ۶/۵ میلی لیتری	یک ویال ۶/۵ میلی لیتری	محلول رنگزا A (Substrate Solution A)
دو ویال ۶/۵ میلی لیتری	یک ویال ۶/۵ میلی لیتری	محلول رنگزا B (Substrate Solution B)
یک ویال ۱۲ میلی لیتری	یک ویال ۱۲ میلی لیتری	محلول متوقف کننده واکنش (Stop Solution)
ویال (های) ۰/۵ میلی لیتری	ویال (های) ۰/۵ میلی لیتری	محلول کنترل (Ferritin Control)
دو ورق	یک ورق	برچسب مخصوص پلیت

توجه ۱: کلیه محلول ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است. توجه ۲: مقادیر کنترل (ها) در COA درج گردیده است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

- دستگاه خوانش گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
- سمپلر کالیبره.
- آب مقطر دیونیزه.

احتیاط در استفاده از کیت:

- محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است لذا از استفاده مشترک با سایر کیت ها و یا شماره های ساخت دیگر جداً خودداری کنید.
- کلیه محلول ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول هایی که تاریخ انقضاء آن ها گذشته است استفاده نکنید.
- توجه فرمایید محلول ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.

۴) محتویات این کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2، HBSAg و بررسی شده اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری را با استفاده از روش های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین با توجه به احتمال آلودگی و بیماری زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل های ایمنی انجام شوند.

۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود و از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری نمایید. ۶) نمونه بیماران، کنترل ها، چاهک ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع آوری، آماده سازی و نگهداری نمونه:

۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم می باشد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه گیری در درستی نتایج به دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید. ۲) در افرادی که دوز بالای از بیوتین ($>5 \text{ mg/day}$) را دریافت می کنند، نمونه گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.

۳) درب ظرف نمونه ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قابل نگهداری هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه ها خودداری کنید.

آماده سازی و نگهداری معرف ها:

۱) آماده سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.

۲) آماده سازی محلول رنگزا: قبل از شروع استفاده از کیت، کل حجم محلول رنگزا B (ویال روشن) را داخل محلول رنگزا A (ویال تیره) خالی نمایید و برای انجام تست تا پایان مصرف کیت استفاده نمایید.

در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی گراد) رسیده اند کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید

۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک ها را همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید.

۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل در چاهک های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک ها ریخته شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه بیوتینی به همه چاهک ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴) چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.

۵) محتویات پلیت را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده مصرف (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت گیر بزنید. به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت^۱ اقدام نمایید.

۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به همه چاهک ها اضافه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

۷) چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.

۸) چاهک ها را مطابق با بند ۵ شستشو دهید.

۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا آماده مصرف (بخش معرف ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

¹ <http://www.idealdiag.com/Training.aspx>

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

EC REP	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
LOT	Batch code
IVD	In vitro diagnostic medical device
CE	European conformity
REF	Catalogue number
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

1. McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
2. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
3. Tietz. Reference information for the clinical laboratory. Hn Textbook of clinical chemistry. Burtis, CA, Ashwood, RA, WB, Saunders. Philadelphia; 1999.

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

توجه: چنانچه از دستگاه‌های الیزا پروسسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.

No.	Sample (ng/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	8.11	-0.8	1.2	2.6	-3.7
2	21.58	1.1	-1.4	-3	3.2
3	87.34	0.9	1.3	1.8	-2.9

۵) بررسی اثر هوک (Hook Effect)

این کیت بر اساس الایزای ساندویچ ترتیبی طراحی شده است؛ بنابراین غلظت‌های بالای آنتی‌ژن منجر به اثر هوک نخواهد شد. در این رابطه، بررسی نمونه‌های حاوی فریتین با غلظت بالاتر از ۵۰۰۰۰ ng/mL توسط کیت حاضر، مقادیر بالایی از جذب نوری را نشان داده است.

۶) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با ۰/۲ ng/mL تعیین گردید.

$$\text{LOD} = \text{LOB} + 1.645 \text{ SD}_s$$

$$\text{LOB} = \text{Mean}_b + 1.645 \text{ SD}_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

۷) بررسی ویژگی - آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)

ویژگی این تست توسط اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مندرج در جدول زیر به نمونه سرم، بررسی شد. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین مقدار ماده اضافه شده به مقدار فریتین مورد نیاز برای ایجاد همان جذب، ارزیابی گردید. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده ۱۰۰±۱۰ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

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

۸) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

Normal Range (ng/mL)	
Males	16 – 220
Females	10 – 124
Newborn	22 – 220
1 – 2 Months	190 – 610
2 – 5 Months	50 – 220
6 Months - 16 Years	10 – 160

پارامترهای کنترل کیفی

۱) بررسی دقت - آزمون دقت درون‌دور (Within-Run)

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean Ferritin (ng/mL)	10.12	54.04	186.48
SD (ng/mL)	0.66	2.72	7.45
CV (%)	6.5	5	4

۲) بررسی دقت - آزمون دقت بین‌دور (Between-Run)

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean Ferritin (ng/mL)	9.56	42.17	204.62
SD (ng/mL)	0.67	2.19	9.27
CV (%)	7	5.2	4.5

۳) بررسی درستی - آزمون بازیابی (Recovery)

در این تست به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به‌عنوان یک نمونه، غلظت فریتین در آن سنجش شد. معیار پذیرش در این آزمایش، $\text{Bias} < 10\%$ نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	% Rec.
1	10.73	198.67	104.7	98.56	94.1
2	9.28	33.58	21.43	22.26	103.9
3	196.55	28.19	112.37	119.33	106.2

۴) بررسی درستی - آزمون خطی بودن (Linearity)

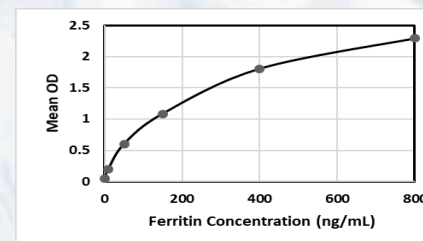
در این تست غلظت فریتین در رقت‌های مختلف نمونه سرم جهت تعیین خطی بودن کیت، اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $\text{Bias} < 10\%$ است.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، زمان اتکوباسیون محلول رنگزا را به‌مدت ۱۵ دقیقه افزایش دهید.

۱۰) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

۱۱) شدت جذب هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از مدت Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش اندازه‌گیری کنید (از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر ارائه شده است.

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (ng/mL)
Cal. A	A1	0.042	0.046	0
	B1	0.051		
Cal. B	C1	0.211	0.204	10
	D1	0.197		
Cal. C	E1	0.574	0.591	50
	F1	0.609		
Cal. D	G1	1.063	1.09	150
	H1	1.117		
Cal. E	A2	1.831	1.84	400
	B2	1.849		
Cal. F	C2	2.233	2.272	800
	D2	2.311		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای فریتین

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر باید برای آنالیت مورد نظر توسط آزمایشگاه تعیین گردد.