

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 05		Ferritin ELISA KIT

آماده سازی	۱۹۲ تستی	۹۶ تستی	۴۸ تستی	معرف
آماده مصرف	2×96 wells	1×96 wells	1×48 wells	پلیت پوشیده شده با استرپتاویدین
آماده مصرف	7 ×1.0 mL	7 ×0.5 mL	7 ×0.5 mL	کالیبراتور ۱-۷ (۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر) در بافر، به همراه نگهدارنده با قابلیت ردیابی نسبت به ماده مرجع WHO IRP 80/602
آماده مصرف	2 ×1.0 mL	2 ×0.5 mL	2 ×0.5 mL	نمونه های کنترل در بافر سازگار با سرم انسانی همراه با نگهدارنده (بازه قابل قبول سرم کنترل بر روی برجسب قید شده است)
آماده مصرف	4 ×12.0 mL	2 ×12.0 mL	1 ×12.0 mL	کونژوگه (قرمز رنگ)
به نسبت ۱ به ۲۰ با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید	1 ×50 mL	1 ×30 mL	1 ×30 mL	محلول شستشو غلیظ 20X
آماده مصرف	2 ×12.0 mL	1 ×12.0 mL	1 ×6.0 mL	محلول سوپسترا-رنگ زا (تترا متیل بنزدین و آب اکسیژنه)
آماده مصرف	1 ×12.0 mL	1 ×6.0 mL	1 ×6.0 mL	محلول توقف (اسید کلریدریک ۱ مولار)

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 05		Ferritin ELISA KIT

کاربرد

کیت الایزای فریتین شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس برای اندازه‌گیری کمی فریتین در سرم یا پلاسمای EDTA به روش الایزا طراحی شده است.

مقدمه

فریتین پروتئینی محلول در آب است که در کنار هموسیدرین نامحلول، فرم‌های ذخیره آهن در بدن محسوب می‌شوند. فرم اصلی آن شامل پوسته‌ای پروتئینی به وزن مولکولی ۴۸ کیلو دالتون به نام آپوفریتین است که از هسته هیدروکسی فسفات آهن که تا ۴۰۰۰ اتم آهن سه ظرفیتی را می‌تواند درون خود جای دهد، تشکیل یافته است. فریتین انسانی در شکل معمول آن که بین تمامی ایزوفرم‌ها مشترک است از ۲۴ زیرواحد با وزن مولکولی ۲۰۰۰ دالتون متشکل از دو زنجیره ایمونولوژیک متفاوت H اسیدی و L بازی ضعیف تشکیل یافته است. حفره داخلی فریتین یا از طریق شش کانال که از میان آن آهن دو ظرفیتی وارد و با مرکز فروکسیدازی زیرواحد H واکنش می‌دهد و یا بعد از احیا به کمک دی هیدروفلاوین یا اسید آسکوربیک که فریتین را آزاد می‌کند، ارتباط دارد.

فرم بنیادی فریتین، عملکرد ذخیره‌سازی بلند مدت آهن را برعهده داشته و در کبد، طحال و مغز استخوان قابل مشاهده است. ایزوفرم اسیدی فریتین در میوکارد، جفت، بافت سرطانی و در مقادیر کمتر در اندام‌های ذخیره‌ای یافت می‌شود. مقدار ناچیز فریتین موجود در سرم حاوی مقادیر کمی آهن بوده و تقریباً به طور کامل از زنجیره L تشکیل یافته است. هر نانوگرم در میلی لیتر فریتین سرم معادل ۱۰ میلی گرم ذخیره تام آهن بدن است و لذا اندازه‌گیری فریتین سرم بهترین و متداول‌ترین شاخص ارزیابی میزان ذخائر آهن بدن و تشخیص کمبود آهن و سایر اختلالات متابولیسم آهن محسوب شده و جایگزین مناسبی برای روش‌های تهاجمی آسپیراسیون مغزاستخوان یا بیوپسی که در واقع استاندارد طلایی تشخیص کم‌خونی فقر آهن محسوب می‌شوند، به شمار می‌رود.

اندازه‌گیری فریتین سرم شاخص مناسبی برای برآورد میزان ذخائر آهن بدن محسوب می‌شود، هرچند بیانگر مقدار آهن در دسترس برای خونسازی نمی‌باشد. کاهش مقدار فریتین به زیر ۱۵ نانوگرم در میلی لیتر بر وجود آنمی فقر آهن دلالت دارد و اغلب متعاقب از دست دادن خون، کاهش جذب آهن

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 05		Ferritin ELISA KIT

از دستگاه گوارش، کمبود ترانسفرین، یا افزایش نیاز (به عنوان مثال در حاملگی) رخ می دهد. لازم به ذکر است، که فریتین، یکی از پروتئین های فاز حاد محسوب می شود و در مواردی نظیر عفونت ، التهاب های حاد و مزمن، یا تومورهای بدخیم، حتی علی رغم وجود فقر آهن، مقدار آن افزایش می یابد. همچنین افزایش سرمی فریتین در هپاتیت ویروسی و الکلی و نارسایی مزمن کلیوی نیز مشاهده شده است. لذا در ارزیابی بیمار باید تابلوی بالینی کلی بیمار مدنظر قرار گیرد.

اساس آزمایش

مبنای کیت سنجش فریتین شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس بر پایه الایزا نوع ساندویچی می باشد. در این کیت از فن آوری استرپتاویدین در پوشاندن فاز جامد استفاده شده است. در روش آزمایش، استاندارد یا کنترل یا نمونه بیمار هم زمان با معرف کونژوگه که حاوی دو نوع آنتی بادی علیه فریتین یکی کونژوگه با بیوتین و دیگری کونژوگه با آنزیم HRP است و فریتین را از دو جایگاه متفاوت شناسایی می کنند به چاهک های پوشیده شده از استرپتاویدین اضافه می شوند. فریتین موجود در استاندارد/کنترل/نمونه بیمار بین دو آنتی بادی به حالت ساندویچ در آمده و مجموعه از طریق بیوتین به استرپتاویدین چاهک میکروتیتر متصل می شود. سپس اجزای متصل نشده طی شستشو از محیط خارج و با افزودن محلول سوبسترا - رنگزا و انکوباسیون بمدت ۱۵ دقیقه رنگ آبی بوجود می آید. با افزودن محلول متوقف گر، واکنش آنزیمی متوقف می گردد و در نهایت شدت جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری می شود. شدت رنگ تولید شده با مقدار فریتین موجود در سرم نسبت مستقیم دارد.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست

۱. سمپلرهای ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتری دقیق. سمپلر ۸ کاناله با قابلیت پپتینگ ۵۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر و یا دیسپنسر اتوماتیک، اگرچه ضروری نیست ولی باعث بهبود قابل توجه تکرارپذیری و صحت نتایج می گردد.

۲. آب مقطر با هدایت کمتر از $1 \mu\text{S}/\text{cm}$

IVD-REF: PS - Ferr	 <p>پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی</p>	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 05		Ferritin ELISA KIT

۳. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.
۴. کاغذ رطوبت گیر
۵. دستگاه واشر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر ۸ کاناله یا سرنگ که قادر به ریختن ۳۵۰ میکرولیتر محلول شست و شو باشد.

نگهداری کیت

۱. کیت پس از تحویل باید در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد (یخچال) نگهداری شود. کلیه معرف ها و اجزاء کیت تا تاریخ انقضاء مندرج بر روی جعبه کیت به شرط نگهداری در دمای یاد شده پایدار هستند.
- هرگز فراتر از تاریخ انقضاء مندرج بر روی جعبه از کیت استفاده نکنید.
۲. غلظت کالیبراتورها و نیز دامنه قابل قبول نمونه های کنترل بر روی ویال درج شده است و ممکن است بین شناسه های مختلف ساخت تفاوت داشته باشد.
۳. از انجماد کیت یا اجزاء کیت خودداری نمایید.
۴. میکروپلیت باید در کیسه در بسته به همراه نمگیر نگهداری شود. در هنگام استفاده پس از رسیدن دمای کیسه میکروپلیت به دمای اتاق، تعداد لازم استریپ را از کیسه آلومینیومی خارج و مابقی همراه نم گیر بلافاصله به کیسه منتقل و درب کیسه با دقت بسته و به یخچال منتقل گردد.
۵. محلول شستشو باید روزانه و تازه تهیه شود و در همان روز تهیه مصرف شود.
۶. تغییر در خصوصیات فیزیکی معرف ها نظیر وجود ذرات معلق در آنها اغلب حاکی از آلودگی و خرابی معرف ها می باشد.
۷. محلول سوبسترا-رنگ زا باید بی رنگ باشد. وجود رنگ آبی در این محلول نشان از خرابی و آلودگی آن دارد و باید دور ریخته شود.
۸. کیت های باز شده اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شوند، حداکثر به مدت ۸ هفته پایدار خواهند بود.

IVD-REF: PS - Ferr	 <p>پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تست‌های آوری</p>	کیت الیزا فریتین
Ver. No: 05		Ferritin ELISA KIT

۹. اجزاء کیت ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابجایی درب معرف ها جلوگیری شود.

۱۰. استفاده از سر سمپلر یکبار مصرف برای دقت و صحت و پرهیز از آلودگی برای برداشتن نمونه ها استانداردها و کنترل ها ضروری است.

جمع آوری و آماده سازی نمونه

۱. سرم یا پلاسمای EDTA نمونه مناسب برای این آزمایش است.
۲. از نمونه های با کدورت بالا، همولیز یا لیپمیک ترجیحا استفاده نشود.
۳. در صورتی که انجام آزمایش در همان روز جمع آوری نمونه امکان پذیر نباشد، نمونه ها را می توان برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگه داری کرد. برای مدت طولانی تر نمونه ها باید در دمای 20°C - سانتیگراد نگهداری شود.
۴. از ذوب و انجماد مکرر نمونه ها اجتناب شود. نمونه های منجمد باید قبل از آزمایش به آرامی، اما به طور کامل مخلوط شده تا کاملاً یکنواخت و همگن گردد.

احتیاطات و هشدارها

۱. کیت فقط برای تشخیص طبی آزمایشگاهی کاربرد دارد.
۲. کلیه معرف های کیت برای سنجش مستقیم فریتین سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده اند و برای سنجش فریتین سایر مایعات بیولوژیک یا پلاسمای غیر EDTA مناسب نمی باشد.
۳. قبل از آغاز سنجش، دستورالعمل پیش رو را به دقت مطالعه نموده و اطمینان حاصل کنید که تمامی نکات آن را به خوبی فرا گرفته اید. همواره از ویرایش معتبر و به روز دستورالعمل که درون کیت موجود می باشد، استفاده کنید.
۴. کلیه جوانب ایمنی در اجرای آزمایش رعایت شود. برای آگاهی از احتیاطات لازم به "راهنمای اصول کلی حفاظت و پیشگیری از آلودگی کارکنان و محیط آزمایشگاه (روش های صحیح میکروب شناسی

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص‌های و تست‌های نوآوری	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 05		Ferritin ELISA KIT

و تکنیک های صحیح آزمایشگاهی)“ تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش ۱۳۹۳ مراجعه نمایید.

۵. از تماس تمام معرف ها به ویژه محلول متوقف گر که حاوی اسید کلریدریک است با پوست جلوگیری شود. در صورت تماس با آب و صابون شستشو داده شود.

۶. با کلیه نمونه های بیمار به عنوان نمونه های بالقوه عفونی برخورد نمایید.

۷. در این کیت برای ساخت برخی اجزا از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر آنتی بادی علیه HIV-1 and 2 و HCV و آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg)، منفی گزارش شده اند، ولی از آنجایی که هیچ آزمایشی نمی تواند به طور کامل ایمنی یک نمونه با منشاء انسانی را تضمین نماید، با آن همانند یک نمونه بالقوه عفونی رفتار نمایید.

۸. برخی از معرف ها حاوی سدیم آزاید به عنوان نگهدارنده می باشند. سدیم آزاید ممکن است با سرب و مس موجود در لوله کشی آب شهری واکنش داده و تولید آزیدهای فلزی قابل انفجار کند. جهت آگاهی از نحوه دفع پسماندهای آزمایشگاهی به “دستورالعمل نحوه مدیریت پسماندهای آزمایشگاهی” تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش ۱۳۹۴ مراجعه نمایید.

آماده سازی معرف ها:

۱. همه معرف ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (۲۷-۲۰ درجه سانتیگراد) برسند.

۲. تهیه محلول شستشو: برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمائید.

نکات مهم در انجام تست:

۱. فرایند شستشو از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. شستشوی ناکافی باعث عدم جدا شدن پیوندهای غیر اختصاصی و جذب نوری زمینه (Background) می گردد.

۲. کیفیت آب مقطر مصرفی در کیفیت محلول شستشو و جدا کردن پیوندهای غیر اختصاصی اهمیت زیادی دارد.

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 05		Ferritin ELISA KIT

۳. در مواردی که مقدار فریتین نمونه بیش از 1000 ng/mL باشد، نمونه را با استاندارد صفر کیت رقیق و سپس آزمایش را تکرار نموده و ضریب رقت را در محاسبه نهایی منظور نمایید.
۴. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده و به خوبی مخلوط شده باشند.
۵. دمای مطلوب محیط آزمایشگاه برای آزمایش های الایزا ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتیگراد می باشد.
۶. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش به خوبی مخلوط نمایید.
۷. بهتر است استانداردها، کنترل ها و نمونه ها را به صورت دوتایی (Duplicate) و ترجیحاً در دو چاهک عمودی آزمایش کنید و میانگین جذب نوری دو چاهک جهت محاسبه نتایج مورد استفاده قرار گیرد.
۸. جهت پپیت کردن محلول سوبسترا-رنگ زا و محلول متوقف گر از میکروپپیت های حاوی قطعات فلزی استفاده نکنید.
۹. از تغییر در هریک از مراحل انجام آزمایش نظیر دفعات شستشو یا زمان انکوباسیون خودداری نمایید. حداکثر دامنه قابل قبول زمان انکوباسیون $\pm 5\%$ می باشد.
۱۰. در کیت فریتین شرکت پیشگامان سنجش به دلیل استفاده از استرپتاویدین برای پوشاندن کف چاهک، تا زمان افزودن کونژوگه عملاً واکنشی در چاهک رخ نمی دهد، بنابراین، جز خطای ناشی از تبخیر نمونه (در صورتی که ریختن استانداردها، کنترل ها و نمونه ها بیش از ۵ دقیقه به طول بیانجامد) خطای قابل توجهی از ناحیه اختلاف زمانی بین ریختن اولین نمونه و آخرین نمونه رخ نمی دهد. با این وجود پپیتینگ چاهک ها با محلول کونژوگه نباید بیشتر از ۵ دقیقه به طول بیانجامد، لذا توصیه می شود، اگر کل پلیت هم زمان ران می شود، برای پرهیز از خطای ناشی از اختلاف زمانی، از تجهیزاتی نظیر دیسپنسر اتوماتیک یا سمپلر هشت کاناله برای ریختن معرف ها استفاده شود.
۱۱. در هر بار انجام آزمایش منحنی کالیبراسیون را مجدد ترسیم نموده و برای محاسبه نتایج از منحنی ذخیره شده استفاده نکنید.
۱۲. مراحل آزمایش را بدون وقفه انجام دهید. وقفه بین مراحل باعث نتایج کاذب می گردد.

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص‌های و تست‌های آنتی	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 05		Ferritin ELISA KIT

۱۳. در کلیه مراحل انجام آزمایش و متعاقب هر مرحله پیپتینگ، چاهک‌ها از نظر وجود حباب بررسی شوند. در صورت وجود حباب با ضربه آهسته به پلیت از محیط خارج شوند.

۱۴. هر نوع نمونه یا ماده کنترلی که حاوی سدیم آزاید یا تیومرسال باشد، با این کیت سازگار نبوده و آزمایش بر روی آنها ممکن است به حصول پاسخ‌های کاذب بیانجامد.

روش انجام آزمایش:

- ۱- تعداد چاهک‌های کوت شده برای استانداردها، کنترل‌ها و نمونه‌های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک‌ها را همراه ماده نمگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.
- ۲- ۲۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل‌ها و نمونه‌های بیمار به داخل هر چاهک بریزید.
- ۳- ۲۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه، به تمام چاهک‌ها اضافه کنید.
- ۴- پلیت را بمدت ۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک‌ها به خوبی مخلوط شوند. سپس درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا بمدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق (20°C - 27°C) انکوبه کنید.
- ۵- محتویات چاهک‌ها را خالی کرده و چاهک‌ها را طبق دستورالعمل زیر شستشو دهید:
 - برای شستشوی چاهک‌ها، ابتدا ۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک‌ها را وارونه کرده و همراه با تکان دادن خالی کنید و عمل شستشو را چهار بار دیگر (جمعاً به مدت ۵ بار) تکرار کنید. در انتهای شستشو، با ضربه زدن ملایم پلیت بر روی کاغذ جاذب رطوبت، تمامی مایع موجود در چاهک‌ها را تخلیه نمایید.
 - بهتر است برای شستشو از دستگاه‌های اتوماتیک‌واشر که قابل برنامه‌ریزی است استفاده نمایید. در این صورت به دستورالعمل دستگاه شستشو مراجعه نمایید.
- ۶- ۱۰۰ میکرولیتر از سوپسترا-رنگ را آماده مصرف به تمامی چاهک‌ها اضافه کنید و آنها را بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید.

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الیزا فریتین
Ver. No: 05		Ferritin ELISA KIT

۷- ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همان ترتیبی که محلول سوبسترا رنگ زا را اضافه نمودید، به همه چاهک ها اضافه کنید. سپس حداکثر ظرف مدت ۱۰ دقیقه جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر قرائت نمایید (در صورت امکان از طول موج ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر فرانس استفاده کنید).

محاسبه نتایج:

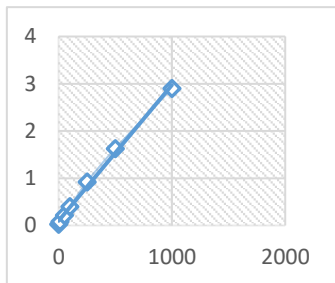
۱. با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها بر روی محور عمودی (محور Y) و غلظت مشخص آنها بر روی محور افقی (محور X) بر روی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد را از طریق ترسیم خطوطی که از تمامی نقاط تلاقی عبور کرده باشد، ترسیم کنید.
۲. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا 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. در صورتی از اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت که مجهز به سیستم داخلی پردازش داده است استفاده می کنید، جهت محاسبه نتایج و ترسیم منحنی کالیبراسیون به دستورالعمل دستگاه مراجعه نمایید. برای محاسبه نتایج کیت فریتین شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس از مدل محاسباتی نقطه-به-نقطه (Point-to-point) استفاده کنید.
- ۴.

داده های نمادین منحنی کالیبراسیون

مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل بعنوان داده های نمادین آورده شده است. لازم به یادآوری است این داده ها فقط جنبه راهنمایی داشته و هر آزمایشگاه باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید براساس نتایج بدست آمده در آزمایشگاه خویش ترسیم نماید.

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص‌های و تست‌های نوآوری	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 05		Ferritin ELISA KIT

Row	ng/mL	OD
1	0	0.03
2	10	0.08
3	50	0.22
4	100	0.4
5	250	0.92
6	500	1.63
7	1000	2.9



کنترل کیفی:

در هر کیت یک نمونه کنترل وجود دارد که مقادیر مورد انتظار برای آن بر روی برچسب ویال درج شده است. علاوه بر کنترل داخل کیت، آزمایشگاه می‌تواند از نمونه‌های سرم انباشته (Pooled serum) که در خود آزمایشگاه تهیه شده یا نمونه‌های کنترل خارجی نیز استفاده نماید. در دو حالت یاد شده لازم به ذکر است که آزمایشگاه باید مقدار هدف، انحراف معیار نتایج و کرانه‌های بالایی (UCL) و پایینی (LCL) قابل قبول را خود محاسبه و مبنای برنامه‌های کنترل کیفی خویش قرار دهد.

بازه مرجع

در بررسی‌های به عمل آمده بر روی تعدادی افرادی سالم دامنه مرجع زیر براساس درون یابی دامنه بین ۲/۵٪ و ۹۷/۵٪ مرکزی با استفاده از کیت الایزا فریتین شرکت پیشگامان سنجش بدست آمده است. لازم به ذکر است به دلیل تفاوت‌های بیولوژیک بین جمعیت‌های مختلف، و همچنین عواملی نظیر سن، جنس، نژاد، عوامل جغرافیایی هر آزمایشگاه باید ابتدا انتقال پذیری (transferability) این داده‌ها

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص‌های و تست‌های آنتی‌بیوتیک	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 05		Ferritin ELISA KIT

را در خصوص جمعیت مورد نظر خویش راستی آزمایی (Verification) کرده و در صورت مشاهده نا همخوانی، بازه مرجع خود را بدست آورد.

محدوده طبیعی بر حسب واحد (ng/ml)	
۲۰-۳۰۰	آقایان
۱۰-۱۰۰	خانم ها قبل از یائسگی
۲۰-۲۰۰	خانم های یائسه
۱۵۰-۵۰۰	نوزادان

خصوصیات اجرایی کیت

۱- حد پایینی آشکارسازی (Lower limit of detection):

حد شاهد (Limit-of-Blank: LOB) و حد آشکار سازی (Limit-of-detection: LOD) مطابق با راهنمای EP 17-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) بدست آمد. به طور خلاصه حد بلانک تحت عنوان مقدار صدک ۹۵ام (95th percentile) از ۶۰ بار اندازه گیری بر روی نمونه شاهد (استاندارد صفر) طی چندین ران بدست آمد. حد بلانک معادل غلظتی در نظر گرفته شده که ۹۵٪ از ۶۰ نتیجه اندازه گیری های تکراری، مقداری کمتر از آن بدست آمده است. حد شاهد به روش فوق معادل 0.15 ng/mL بدست آمد. برای تعیین حد آشکار سازی ۲۰ اندازه گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم (n=۲۰×۳=۶۰) با محتوای فریتین کمتر از 4.0 ng/mL که مقدار فریتین آن به روش مستقل دیگری تعیین شده بود طی سه روز متوالی انجام گردید و بزرگترین انحراف معیار اندازه

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص‌های تشخیصی و تست‌های آوری	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 05		Ferritin ELISA KIT

گیری های تکراری بر روی سه نمونه یادشده مبنای تعیین حد آشکار سازی قرار گرفت. از رابطه زیر حد آشکار سازی پس از گرد کردن روبه بالا معادل 2.0 ng/mL تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645SD_{Low}$$

۲- دقت (Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت فریتین شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس و ۳ انباشته سرمی تهیه شده از نمونه های بیمار در نقاط مختلف بازه اندازه گیری (2.0-1000 ng/mL) مطابق با راهنمای EP 05-A3 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) بدست آمد. به طور خلاصه، طی ۱۰ روز کاری، سه کاربر و هر یک روزانه سه ران اندازه گیری های تکراری به صورت دوتایی در هر ران بروی نمونه های یاد شده انجام دادند (۲×۳×۱۰). نتایج با روش آماری Fully nested ANOVA تحلیل گردید، که خلاصه نتایج در جدول زیر آورده شده است:

	Within-Laboratory Precision	Sample Description	Mean (ng/mL)	Repeatability	Within-Laboratory Precision
		SD	%CV	SD	%CV
Patient Pool	8.50	0.720	8.47	1.090	12.82
Patient Pool	78.50	4.62	5.89	5.34	6.80
Patient Pool	589.00	4.17	0.71	28.56	4.85

۳- اختصاصیت (Specificity):

ارزیابی اختصاصیت مطابق با راهنمای EP 07-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI)، جهت تعیین واکنش متقاطع (cross reaction) کیت سنجش فریتین

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الیزا فریتین
Ver. No: 05		Ferritin ELISA KIT

پیشگامان سنجش ایساتیس با آلبومین سرم انسانی، آلفا فتو پروتئین، و ترانسفرین انسانی صورت گرفت. نمونه های حاوی واکنشگرهای متقاطع از طریق spike کردن سرم انسانی طبیعی با مواد حاوی سطوح بالای از همان واکنشگرها به گونه ای که ماتریکس سرم بیش از ۱۰ درصد تغییر نکند، تهیه گردید. سپس مقدار فریتین همزمان در یک ران در نمونه هایی که با ماتریکس بی اثر spike شده بودند و نمونه هایی که با واکنشگرهای متقاطع spike شدند، اندازه گیری شده و مقدار واکنش پذیری متقاطع هر نمونه از رابطه زیر محاسبه شد و به صورت نسبت به غلظت فریتین اولیه بیان گردید. نتایج در جدولی که در ادامه می آید خلاصه شده است:

$$\% \text{cross - reactivity} = \frac{\text{mean conc. of spiked sample} - \text{mean conc. of unspiked sample}}{\text{spiked conc.}} \times 100$$

همچنین ارزیابی درصد تداخل از ناحیه مداخله گریهای معمول آزمایش های بیوشیمیایی انجام و مشخص گردید، که هموگلوبین تا ۵۰ میلیگرم در میلی لیتر، بیلیروبین غیرکونژوگه تا ۲۰ میلیگرم در دسی لیتر و تری گلیسریدها تا ۱۰۰۰ میلیگرم در دسی لیتر تأثیری بر اندازه گیری فریتین به روش پیشگامان ندارد.

نوع ماده	غلظت	درصد تداخل (%)
آلبومین سرم انسانی	500 µg/ml	0.08
آلفا- فتو پروتئین	500 µg/ml	0.13
ترانسفرین	500 µg/ml	0.06

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص‌های و تست‌های نوآوری	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 05		Ferritin ELISA KIT

۴- خطی بودن (Linearity):

به منظور ارزیابی خطی بودن یک نمونه با غلظت اولیه 813 ng/mL با نمونه دیگری با غلظت 12 ng/mL به نسبت های مختلف رقیق شد و رقت های مختلف به صورت مضاعف اندازه گیری و نتایج، با مقادیر مورد انتظار ، که از راه فرمولاسیون بدست آمد مقایسه شد و میزان بازبایی و سوگرایی را در نقاط مختلف محاسبه که نتایج در جدول زیر خلاصه شده است:

No.	Ratio	Expected (ng/mL)	Rep 1 (ng/mL)	Rep 2 (ng/mL)	recovery %	%Bias
1	1	813	813	813	NA	NA
2	0.9	726.6	731	739	101.16%	1.16%
3	0.8	647.2	664	656	101.98%	1.98%
4	0.7	567.8	534	541	94.66%	5.34%
5	0.6	488.4	465	452	93.88%	6.12%
6	0.5	409	416	435	104.03%	4.03%
7	0.4	329.6	318	337	99.36%	0.64%
8	0.2	170.8	165	156	93.97%	6.03%
9	0.1	91.4	96	102	108.32%	8.32%
10	0	12	12	12	NA	NA

NA: کاربردی ندارد.

۵- درستی (Trueness):

۱-۵- ارزیابی بازبایی (Recovery Evaluation)

ارزیابی خطای سیستماتیک یا بایاس روش به دو صورت انجام گرفت. ابتدا میزان خطای سیستماتیک نسبی (Proportional Error) از طریق مطالعات بازبایی و با افزودن مقادیر مشخص از فریتین به چندین نمونه در نواحی مختلف بازه اندازه گیری انجام گرفت.

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص‌های و تست‌های نوآوری	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 05		Ferritin ELISA KIT

به طور خلاصه نمونه اولیه به دو بخش مساوی تقسیم و به یکی حجمی از سرم حاوی مقدار فریتین و به دیگری همان حجم استاندارد صفر به گونه ای که ماتریکس نمونه بیش از ۱۰ درصد تغییر نکند افزوده شد. و سپس بررسی توانمندی سیستم اندازه گیری در تشخیص مقدار افزوده شده از طریق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\%Recovery = \frac{Concentration\ Recovered}{Concentration\ Added} \times 100$$

همچنین مقدار خطای سیستماتیک که به زبان ریاضی با بایاس بیان می گردد، از رابطه زیر بدست آمد:

$$\%Bias = \frac{\bar{X}\ measured - expected}{Expected} \times 100$$

نتایج این ارزیابی در جدول زیر خلاصه شده است:

Sample	Original Concentration (ng/mL)	Added ferritin (ng/mL)	Expected value (ng/mL)	Observed Value (ng/mL)	Recovery %	Bias%
1	21.15	100	121.1	136.75	115.6	12.88%
2	60.8		5			
3	129.15		160.8	168.75	107.95	4.94%
4	225.1		229	228.7	99.55	-0.20%
5	728		325	337	112	3.61%
			828	811	83	-2.05%

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تست‌های غربی	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 05		Ferritin ELISA KIT

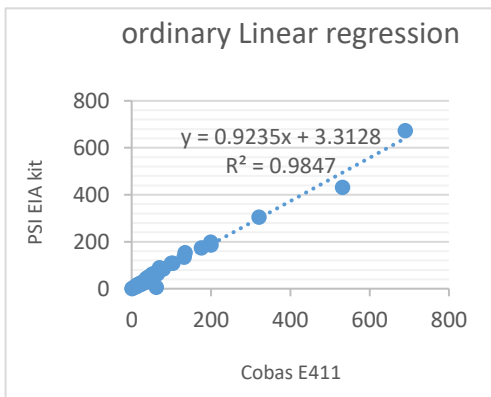
۲-۵- ارزیابی مقایسه‌ای (Method comparison)

ارزیابی مقایسه‌ای بین نتایج اندازه‌گیری کیت سنجش فریتین سرم شرکت پیشگامان و روش ECLIA-elecsys ferritin, Cobas E411-Roche diagnostic (n=80, range:2.1-670 ng/mL) مطابق با راهنمای EP 09-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) انجام و به روش رگرسیون خطی تحلیل گردید. خلاصه نتایج و نمودار رگرسیون خطی (Linear regression) در ادامه آورده شده است:

$$PS\ EIA = 0.9235CLIA + 3.3128$$

$$r = 0.9923$$

$$r^2 = 0.9847$$



۶- پدیده هوک:

در این کیت پدیده هوک تا غلظت 3000 ng/mL مشاهده نگردید.

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه تخصصی تشخیص و تست‌های نوآوری	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 05		Ferritin ELISA KIT

منابع و مراجع:

1. CLSI. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline. 2nd ed. CLSI document EP 17-A2. Pierson-Perry J.F. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2012.
2. CLSI. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline. CLSI document EP 05-A3. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2014.
3. CLSI. Interference Testing in clinical chemistry; approved guideline. 2nd ed. CLSI document EP07-A23. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2005.
4. Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation, <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>
5. Hoff rand A.W. et al. (2011). Postgraduate Haematology. 6th ed (pp 28-29). Wiley Blackwell. John wiley & Sons, Ltd, publication
6. Kasper D.L. et al. (2015). Harrison's principles of internal medicine. 19th ed. (pp. 1817). Mc Graw Hill Education
7. McPherson R.A. et al. (2017). HENRY'S clinical diagnosis and management by laboratory Methods. 23rd ed. (pp. 562). Elsevier Inc.
8. Pagana K.D. et al. (2018). Mosby's Manual of diagnostic and Laboratory tests. (pp. 211-213). 6th ed. Elsevier Inc.
9. Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics. 6th ed. (pp. 756-9). Elsevier Inc.

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش، تشخیص و تست‌های آزمایشگاهی	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 05		Ferritin ELISA KIT

خطایابی در آزمایش‌های الایزا

نوع مشکل	علت مشکل	راه حل
پایین بودن OD استانداردها و نمونه‌ها	افت و یا آلودگی کونژوگه	تکرار تست با کونژوگه جدید
	پایین بودن دما و یا کوتاه بودن زمان انکوباسیون، به دما نرسیدن محلولهای کیت و نمونه بیماران	۱. دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید. ۲. قبل از شروع آزمایش کیت و نمونه بیماران به دمای اتاق برسد.
	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها	۱. PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲. پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	۱. پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. ۲. پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.
	طول موج خوانش نامناسب (۴۰۵ nm بجای ۴۵۰ nm)	۱. تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. ۲. طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید.

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پزشکیان در زمینه تشخیصی و تست‌های آنتی‌بیوتیک	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 05		Ferritin ELISA KIT

<p>۱. استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف</p> <p>۲. از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید.</p> <p>۳. توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد.</p> <p>۴. توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود.</p>	<p>پیپتینگ نامناسب</p>	<p>صحیح نبودن نمودار استانداردها</p>
<p>۱. PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید.</p> <p>۲. پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.</p>	<p>PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer. شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها</p>	
<p>تکرار تست با استاندارد های جدید</p>	<p>آلودگی استاندارد صفر</p>	
<p>استفاده از محلول رنگزا جدید</p>	<p>آلودگی محلول رنگزا</p>	
<p>۱. عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید.</p> <p>۲. تمام سوزن های دستگاه و اشرف را چک کنید.</p>	<p>آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer. شستشوی نامناسب</p>	<p>بالا بودن رنگ زمینه،</p>
<p>۱. تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید.</p> <p>۲. طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.</p> <p>۳. از فیلتر ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر فرانس استفاده کنید.</p>	<p>طول موج نامناسب در خوانش</p>	<p>بالا بودن OD</p>
<p>تکرار تست با محلول Stop جدید</p>	<p>آلودگی محلول Stop</p>	

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص‌های و تست‌های نوآوری	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 05		Ferritin ELISA KIT

تکرار تست با مواد همان کیت	استفاده از مواد سایر کیت ها	عدم تولید رنگ در چاهک ها
تکرار تست	انجام نشدن مرحله ای از تست	
تکرار تست با محلول رنگزا جدید	آلودگی محلول رنگزا	
تکرار تست با محلول کونژوگه جدید	آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید	
۱. استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف ۲. از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید ۳. توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. ۴. توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نشود. ۵. توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد. ۶. کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلر ها	پیپتینگ نامناسب، گرفتگی لوله داخلی سمپلر بواسطه آلودگی	عدم تکرار پذیری مناسب
فاصله زمانی بین اضافه کردن استاندارد ها و نمونه نباید بیشتر از ۱۰ دقیقه باشد. در این صورت نتایج قابل اعتماد نیست.	طولانی شدن زمان انجام تست	
پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید.	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص‌های و تست‌های آتوری	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 05		Ferritin ELISA KIT

<p>پیتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید.</p>	<p>باقی ماندن کونژوگه در لبه چاهکها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها</p>	
<p>در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک‌ها نباشد.</p>	<p>وجود حباب در چاهک‌ها</p>	
<p>کف چاهکها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید.</p>	<p>کثیف بودن کف چاهکها</p>	
<p>قبل از استفاده، ویال محلول‌ها را به آرامی تکان دهید.</p>	<p>مخلوط نشدن محلول‌های کیت</p>	