

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در سنجش‌های و تشخیصی	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 08		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	6 ×1.0 mL	6 ×0.5 mL	6 ×0.5 mL	کالیبراتور ۱- (۰.۰، 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 سوبسترا-رنگ زا (ترا 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 آزمایشگاه در زمینه تشخیص و کنترل کیفیت	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 08		Ferritin ELISA KIT

کاربرد

کیت الایزای فریتین شرکت پیشگامان سنجش ایستاتیس برای اندازه گیری 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، فرم های ذخیره آهن در بدن محسوب می شوند. فرم اصلی آن شامل پوسته ای پروتئینی به وزن مولکولی ۴۸ کیلودالتون به نام آپوفریتین است که از هسته هیدروکسی فسفات آهن که تا ۴۰۰۰ اتم آهن سه ظرفیتی را می تواند درون خود جای دهد، تشکیل یافته است. فریتین انسانی در شکل معمول آن که بین تمامی ایزوفرم ها 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 می دهد و یا بعد از احیا به کمک دی هیدروفلاوین یا اسید آسکوربیک که فریتین را آزاد می کند، ارتباط دارد.

فرم بنیادی فریتین، عملکرد ذخیره سازی 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 اندام های ذخیره ای یافت می شود. 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 اندازه گیری فریتین سرم بهترین و متداول ترین شاخص ارزیابی میزان ذخائر آهن بدن و تشخیص کمبود آهن و سایر اختلالات متابولیسم آهن محسوب شده و جایگزین مناسبی برای روش های تهاجمی آسپیراسیون مغزاستخوان یا بیوپسی که در واقع استاندارد طلایی تشخیص کم خونی فقر آهن محسوب می شوند، به شمار می رود.

اندازه گیری فریتین سرم شاخص مناسبی برای برآورد میزان ذخائر آهن بدن محسوب می شود، هرچند بیانگر مقدار آهن در دسترس برای خونسازی نمی باشد. کاهش مقدار فریتین به زیر ۱۵ نانوگرم در میلی لیتر بر وجود آئمی فقر آهن دلالت دارد و اغلب متعاقب از دست دادن خون، کاهش جذب آهن از دستگاه گوارش، کمبود ترانسفرین، یا افزایش نیاز (به عنوان مثال در حاملگی) رخ می دهد. لازم به

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پزشک گام در سنجش های تشخیصی و آزمایشگاهی	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 08		Ferritin ELISA KIT

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 هیپاتیت 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 ایستایس 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 پیتینگ 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 ۱ $\mu S/cm$

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

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص و کنترل کیفیت	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 08		Ferritin ELISA KIT

۴. کاغذ رطوبت گیر
۵. دستگاه واشِر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر ۸ کاناله یا سرنگ که قادر به ریختن ۳۵۰ میکرولیتر محلول شست و شو باشد.

نگهداری کیت

- 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.
- 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.
- از انجماد کیت یا اجزاء کیت خودداری نمایید.
- 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.
- محلول شستشو باید روزانه و تازه تهیه شود و در همان روز تهیه مصرف شود.
- تغییر در خصوصیات فیزیکی معرف ها نظیر وجود ذرات معلق در آنها اغلب حاکی از آلودگی و خرابی معرف ها می باشد.
- محلول سوپسترا-رنگ را باید بی رنگ باشد. وجود رنگ آبی در این محلول نشان از خرابی و آلودگی آن دارد و باید دور ریخته شود.
- کیت های باز شده اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شوند، حداکثر به مدت ۸ هفته پایدار خواهند بود.
- اجزاء کیت ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابجایی درب معرف ها جلوگیری شود.

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه‌های تشخیص و کنترل بیماری‌ها	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 08		Ferritin ELISA KIT

۱۰. استفاده از سر سمپلر یکبار مصرف برای دقت و صحت و پرهیز از آلودگی برای برداشتن نمونه‌ها استاندارد‌ها و کنترل‌ها ضروری است.

جمع آوری و آماده سازی نمونه

۱. سرم یا پلاسمای EDTA نمونه مناسب برای این آزمایش است.

۲. از نمونه‌های با کدورت بالا، همولیز یا لیپمیک ترجیحاً استفاده نشود.

۳. در صورتی که انجام آزمایش در همان روز جمع آوری نمونه امکان پذیر نباشد، نمونه‌ها را می‌توان برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگه‌داری کرد. برای مدت طولانی‌تر نمونه‌ها باید در دمای 20°C - سانتیگراد نگهداری شود.

۴. از ذوب و انجماد مکرر نمونه‌ها اجتناب شود. نمونه‌های 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 معرف‌های کیت برای سنجش مستقیم فریتین سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده‌اند و برای سنجش فریتین سایر مایعات بیولوژیک یا پلاسمای غیر EDTA مناسب نمی‌باشد.

۳. قبل از آغاز سنجش، دستورالعمل پیش‌رو را به دقت مطالعه نموده و اطمینان حاصل کنید که تمامی نکات آن را به خوبی فرا گرفته‌اید. همواره از ویرایش معتبر و به روز دستورالعمل که درون کیت موجود می‌باشد، 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 (روش‌های صحیح میکروب‌شناسی و تکنیک‌های صحیح آزمایشگاهی)" تألیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش ۱۳۹۳ مراجعه نمایید.

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص و کنترل عفونت	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 08		Ferritin ELISA KIT

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.
۹. این کیت به روش دستی (غیر دستگاهی) می باشد، برای انجام تست با روش دستگاهی با کارشناسان فنی این شرکت تماس حاصل 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.

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص و کنترل کیفیت	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 08		Ferritin ELISA KIT

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

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش روانشناسی و روانشناسی و روانشناسی و روانشناسی	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 08		Ferritin ELISA KIT

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.

۱۳. در کلیه مراحل انجام آزمایش و متعاقب هر مرحله پیپتینگ، چاهک ها 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 آزاد یا تیومرسال باشد، با این کیت سازگار نبوده و آزمایش بر روی آنها ممکن است به حصول پاسخ های کاذب بیانجامد.

روش انجام آزمایش:

- ۱- تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده نمگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.
- ۲- ۲۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار به داخل هر چاهک بریزید.
- ۳- ۲۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه ، به تمام چاهک ها اضافه کنید.
- ۴- پلیت را بمدت ۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها به خوبی مخلوط شوند. سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا بمدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق (۲۷-۲۰°C) انکوبه کنید.

۵- محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را طبق دستورالعمل زیر شستشو دهید:

- برای شستشوی چاهک ها، ابتدا ۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک ها 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 چاهک ها را تخلیه نمایید.

- بهتر است برای شستشو از دستگاه های اتوماتیک و اشرف که قابل برنامه ریزی است استفاده نمایید. که در این صورت به دستورالعمل دستگاه شستشو مراجعه نمایید.

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و آزمایشگاهی	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 08		Ferritin ELISA KIT

۶- ۱۰۰ میکرولیتر از سوپسترا-رنگ را آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

۷- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همان ترتیبی که محلول سوپسترا رنگ 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 الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول موج ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید).

محاسبه نتایج:

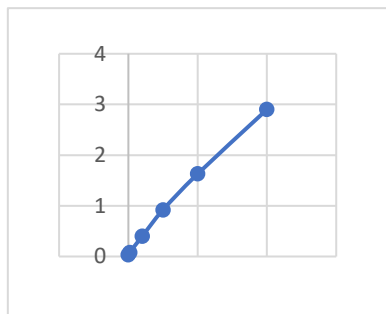
۱. با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها بر روی محور عمودی (محور Y) و غلظت مشخص آنها بر روی محور افقی (محور X) بر روی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد را از طریق ترسیم خطوطی که از تمامی نقاط تلاقی عبور کرده باشد، ترسیم کنید.
۲. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا 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.

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 سنجش‌های و تشخیص‌های	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 08		Ferritin ELISA KIT

Row	ng/mL	OD
1	0	0.03
2	10	0.08
3	100	0.4
4	250	0.92
5	500	1.63
6	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 می تواند از نمونه های سرم انباشته (Pooled serum) که در خود آزمایشگاه تهیه شده یا نمونه های کنترل خارجی نیز استفاده نماید. در دو حالت یاد شده لازم به ذکر است که آزمایشگاه باید مقدار هدف، انحراف معیار نتایج و کرانه های بالایی (UCL) و پایینی (LCL) قابل قبول را خود محاسبه و مبنای برنامه های کنترل کیفی خویش قرار دهد.

بازه مرجع

در بررسی های 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 تفاوت های بیولوژیک بین جمعیت های مختلف، و همچنین عواملی نظیر سن، جنس، نژاد، عوامل جغرافیایی هر آزمایشگاه باید ابتدا انتقال پذیری (transferability) این داده ها را در خصوص جمعیت مورد نظر خویش راستی آزمایی (Verification) کرده و در صورت مشاهده نا همخوانی، بازه مرجع خود را بدست آورد.

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص و کنترل کیفیت	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 08		Ferritin ELISA KIT

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 ۹۵ ام (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 ($n=20 \times 3=60$) 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 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.

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

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش آزمایشگاه در زمینه تشخیص و کنترل کیفیت	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 08		Ferritin ELISA KIT

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 (۲×۳×۳×۱۰). 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 پیشگامان سنجش ایساتیس با آلبومین سرم انسانی، آلفا فئو پروتئین، و ترانسفرین انسانی صورت گرفت. نمونه های حاوی واکنشگرهای متقاطع از طریق spike کردن سرم انسانی طبیعی با مواد حاوی سطوح بالایی 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

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص و کنترل کیفیت	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 08		Ferritin ELISA KIT

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 گری معمول آزمایش های بیوشیمیایی انجام و مشخص گردید، که هموگلوبین تا ۵۰ میلیگرم در میلی لیتر، بیلروبین 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

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 بازیابی و سوگرایی را در نقاط مختلف محاسبه که نتایج در جدول زیر خلاصه شده است:

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش آزمایشگاه در زمینه تشخیص و کنترل کیفیت	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 08		Ferritin ELISA KIT

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):

۵-۱- ارزیابی بازیابی (Recovery Evaluation)

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

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:

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

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص و کنترل کیفیت	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 08		Ferritin ELISA KIT

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

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

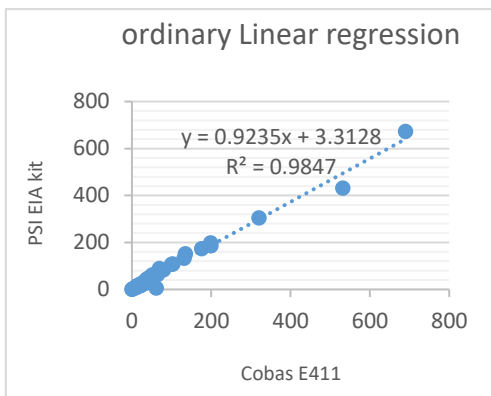
نتایج این ارزیابی در جدول زیر خلاصه شده است:

Sample	Original Concentration (ng/mL)	Added ferritin (ng/mL)	Expected value (ng/mL)	Observed Value (ng/mL)	Recovery %	Bias%
1	21.15	100	121.15	136.75	115.6	12.88 %
2	60.8		160.8	168.75	107.95	4.94%
3	129.15		229	228.7	99.55	- 0.20%
4	225.1		325	337	112	3.61%
5	728		828	811	83	- 2.05%

۲-۵- ارزیابی مقایسه ای (Method comparison)

ارزیابی مقایسه ای بین نتایج اندازه گیری 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:

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص و کنترل عفونی	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 08		Ferritin ELISA KIT



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

$$r = 0.9923$$

$$r^2 = 0.9847$$

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سن‌جش پژوهشگاه در زمینه تشخیص و سلامت عمومی	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 08		Ferritin ELISA KIT

۶- پدیده هوک:

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

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 سنـجـش آزمایشگاه در سنجش تشخیص و کنترل کیفیت	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 08		Ferritin ELISA KIT

خطایابی در آزمایش های الایزا

نوع مشکل	علت مشکل	راه حل
پایین بودن OD استانداردها و نمونه ها	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 چاهک ها	۱. PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲. پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها 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.

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش پزشک نام در سنجش های تشخیصی و آزمایشگاهی	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 08		Ferritin ELISA KIT

از سری استاندارد جدید استفاده کنید.	آلودگی استانداردها	صحیح نبودن نمودار استانداردها
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 نوک سمپلر نشود.	پیپتینگ نامناسب	
۱. PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲. پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.	PH نامناسب و یا غلظت بالایی Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	
تکرار تست با استاندارد های جدید	آلودگی استاندارد صفر	بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD
استفاده از محلول رنگزا جدید	آلودگی محلول رنگزا	
۱. عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲. تمام سوزن های دستگاه و اثر را چک کنید.	آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نامناسب	
۱. تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. ۲. طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. ۳. از فیلتر ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید.	طول موج نامناسب در خوانش	

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنـجش روانشناسی و سلامت روانی	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 08		Ferritin ELISA KIT

تکرار تست با محلول Stop جدید	آلودگی محلول Stop	
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	

IVD-REF: PS - Ferr	 پیشگامان سنجش آزمایشگاه در زمینه تشخیص و کنترل عفونت	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 08		Ferritin ELISA KIT

پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید.	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	
پیپتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.	باقی ماندن کونژوگه در لبه چاهکها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک ها	
در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک ها نباشد.	وجود حباب در چاهک ها	
کف چاهکها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید.	کثیف بودن کف چاهکها	
قبل از استفاده، ویال محلول ها را به آرامی تکان دهید.	مخلوط نشدن محلول های کیت	