ایده‌آل تشخیص آتیه

کیت اندازه‌گیری Ferritin در سرم انسان

Ferritin ELISA Kit

96 Tests: Cat. No: 0824-96

192 Tests: Cat. No: 7624-192

Rev: A2 (1402/04/17)

مقدمه:

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

اصول آزمایش:

این آزمایش براساس الایزای ساندویچ ترتیبی طراحی شده است. با اضافه شدن آنتی‌بادی بیوتینیله و سرم حاوی آنتی‌ژن به چاهک، بی‌حرکت‌سازی کمپلکس‌های ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهک‌ها و آنتی‌بادی بیوتینیله ضد فریتین صورت می‌گیرد. پس از شستشوی چاهک‌ها، آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP اضافه شده و کمپلکس‌های ساندویچ تشکیل می‌شوند. پس از به تعادل رسیدن واکنش و شستشوی مجدد چاهک‌ها، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده ، محصول نهایی تولید می‌شود که بیشترین جذب نوری را در طول‌موج 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 (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

محتویات کیت	کیت ۹۶ تستی	کیت ۱۹۲ تستی
میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده	یک عدد	دو عدد
کالیبراتورها (Ferritin Cal A-F)؛ شش ویال با غلظت‌های ۰، ۱۰، ۵۰، ۱۵۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ ng/mL	یک سری ویال با غلظت‌های مختلف	یک سری ویال با غلظت‌های مختلف
محلول کونژوگه آنزیمی (Ferritin Enzyme Conjugate)	یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی ضد فریتین متصل به آنزیم HRP	دو ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی ضد فریتین متصل به آنزیم HRP
محلول کونژوگه بیوتینی (Ferritin Biotin Conjugate)	یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی بیوتینیله ضد فریتین	دو ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی بیوتینیله ضد فریتین
محلول شستشو (Wash Solution-50X)	یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری	یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری
محلول رنگزا A (Substrate Solution A)	یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	دو ویال ۶/۵ میلی‌لیتری
محلول رنگزا B (Substrate Solution B)	یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	دو ویال ۶/۵ میلی‌لیتری
محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop Solution)	یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری	یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری
محلول کنترل (Ferritin Control)	ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری	ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری
برچسب مخصوص پلیت	یک ورق	دو ورق

توجه ۱: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده 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:

۱) دستگاه خوانش‌گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).

۲) سمپلر کالیبره.

۳) آب مقطر دیونیزه.

احتیاط در استفاده از کیت:

۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری کنید.

۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.

۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.

۴) محتویات این کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2، HBsAg و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین با توجه به احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های 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، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم می‌باشد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.

۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین (>5 mg/day) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.

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

آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:

۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.

۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزای A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزای A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزای B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. 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 نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید.

۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.

توجه: چاهک اول به‌عنوان بلانک در نظر گرفته شود. در این چاهک نمونه و یا کالیبراتور ریخته نشود. بقیه مراحل با سایر چاهک‌ها یکسان می‌باشد.

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

۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.

۵) محتویات پلیت را با وارونه کردن یا آسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده مصرف (بخش آماده سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت[1] اقدام نمایید.

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

ISO13485 KGS

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

۷) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.

۸) چاهک‌ها را مطابق با بند ۵ شستشو دهید.

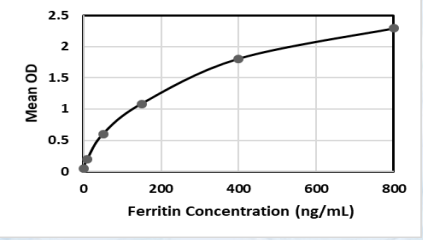
۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به‌مدت ۱۰ 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 طول‌موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش اندازه‌گیری کنید (از طول‌موج 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 مصرف کننده تعیین گردد.

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، 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 Bias<10% است.

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.

$$LOD = LOB + 1.645\ SD_s$$
$$LOB = Mean_b + 1.645\ SD_b$$

(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%

علائم استفاده شده در برچسب 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
Σ	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.

دفتر مرکزی: تهران - بزرگراه آبشناسان - سردارجنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۸
کارخانه: کرج - کمالشهر، شهرک صنعتی بهارستان، انتهای گلستان دوم غربی، پلاک ۱۳ تلفن: ۲۳-۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹.