دیاپلاس

DIAPLUS

DiaPlus

کیت ۹۶ تستی اندازه‌گیری Ferritin به روش الایزا

Brochure Rev: A1 (1402/02/12)

REF 0844-96

اهمیت بالینی

فریتین مهمترین پروتئین ذخیره آهن در بدن است که برای ارزیابی اختلال‌های مربوط به متابولیسم آهن مورد استفاده قرار می‌گیرد. در افراد سالم تقریبا ۷۰ درصد از آهن جذب شده توسط بدن با هموگلوبین موجود در گلبول‌های قرمز خون ترکیب شده و ۳۰ درصد مابقی آن به صورت فریتین یا هموسیدرین در بدن ذخیره می‌شود. 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. تعداد زیادی از بیماری‌های مزمن مانند عفونت‌های مزمن، بیماری‌های التهابی مزمن مانند آرتریت روماتوئید، بیماری‌های قلبی می‌توانند منجر به افزایش سطح فریتین سرم شوند. این کیت برای اندازه‌گیری کمی غلظت فریتین در سرم انسان به‌روش الایزا کاربرد دارد.

اصول آزمایش

اساس آزمایش در این کیت به روش الایزای ساندویچ ترتیبی بوده و 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 و کمپلکس‌های ساندویچ تشکیل می‌شوند. پس از شستشوی مجدد چاهک‌ها، و افزودن محلول سوبسترای آنزیم HRP به چاهک‌ها، رنگ آبی تشکیل می‌شود. با افزودن محلول متوقف‌کننده رنگ آبی تبدیل به رنگ زرد می‌گردد که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را 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

۱) کالیبراتورها (Calibrators) ۰/۷۵ میلی‌لیتر:

شامل شش ویال کالیبراتور با غلظت‌های ۰، ۱۰، ۵۰، ۱۵۰، ۴۰۰، ۸۰۰ (ng/mL).

نکته: کالیبراتورها بر پایه سرم انسانی تهیه شده است.

۲) محلول کونژوگه آنزیمی (Ferritin Enzyme Conjugate) ۱۱ میلی لیتر:

یک ویال شامل محلول آنتی بادی نشان‌دار شده با آنزیم.

۳) محلول کونژوگه بیوتینی (Ferritin Biotin Conjugate) ۱۱ میلی لیتر:

یک ویال شامل محلول آنتی بادی منوکلونال و بیوتینیله شده.

۴) پلیت استرپتاویدین ۹۶ تستی:

یک پلیت حاوی استرپتاویدین تثبیت شده که به همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی بسته‌بندی شده است.

۵) محلول شستشو غلیظ (Wash Buffer-50X) ۲۰ میلی‌لیتر:

یک ویال شامل سورفاکتانت محلول شده در بافرفسفات.

۶) محلول سوبسترا A (Substrate A) ۶/۵ میلی‌لیتر:

یک ویال محلول تترا متیل بنزیدین (TMB).

۷) محلول سوبسترا B (Substrate B) ۶/۵ میلی‌لیتر:

یک ویال محلول هیدروژن پراکساید (H2O2).

۸) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution) ۱۲ میلی‌لیتر:

یک ویال حاوی محلول متوقف کننده واکنش.

۹) سرم کنترل (Ferritin Control):

ویال(های) حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر سرم کنترل.

۱۰) برچسب مخصوص پلیت:

یک ورق.

توجه ۱: کلیه اجزای کیت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود. محلول متوقف‌کننده را می‌توان در دمای اتاق نگهداری کرد.

توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در برگه COA درج شده 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.

موارد احتیاط در استفاده از کیت

این کیت برای انجام تست‌های تشخیصی در محیط‌های آزمایشگاهی کاربرد دارد. محتویات کیت منشا سرم انسانی داشته و از نظر عدم وجود HBsAg و آنتی‌بادی‌های ضد HIV1/2 و HCV کنترل شده‌اند، اما از آنجا که هیچ روشی به‌طور صددرصد نمی‌تواند منفی بودن این موارد را تایید نماید، بنابراین لازم است هنگام استفاده از کیت، مراقبت‌های لازم به عمل آورده شود.

- محتویات تعبیه شده در این کیت برای استفاده در همین سری ساخت بوده و از استفاده مشترک با سایر سری‌ساخت‌ها خودداری فرمایید.
- برای دریافت نتایج بهتر و دقیق‌تر فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ چاهک‌ها رعایت شود. این فاصله زمانی نباید به گونه ای باشد که منجر به اثر دریفت (drift) گردد. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل این نکته حائز اهمیت است. دقت نمایید محلول‌ها نزدیک به ته چاهک ریخته شوند.
- شستشوی نامناسب می‌تواند باعث بوجود آمدن نتایج اشتباه در آزمایش شود.
- کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از استفاده از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است خودداری نمایید.

جمع آوری و تهیه نمونه ها

- نمونه مورد استفاده در این آزمایش سرم انسانی می‌باشد که از خون سیاهرگی تهیه شده و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا می‌گردد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
- نگهداری سرم باید در لوله‌های در بسته انجام شود. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و در صورت استفاده برای مدت زمان طولانی‌تر (حداکثر تا ۳۰ روز) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.
- 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.

آماده سازی محلول‌ها

محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را با ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید. محلول آماده شده را 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.

محلول سوبسترا: محلول‌های سوبسترا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول سوبسترا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول سوبسترا B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول سوبسترا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

مراحل انجام تست

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کلیه ویال‌های کالیبراتور، کنترل و نمونه‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت نمایید.

۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام آزمایش را جدا نموده و چاهک‌های باقی مانده به همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده، درب آن را ببندید و در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم **۲۵** میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌های بیمار و کنترل را در داخل چاهک‌های مورد نظر بریزید. پیشنهاد می‌شود که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود و از میانگین جذب نوری آنها استفاده نمایید.

توجه: چاهک اول به‌عنوان بلانک در نظر گرفته شود. در این چاهک، نمونه، کنترل و یا کالیبراتور ریخته نشود. بقیه مراحل همانند سایر چاهک‌ها می باشد.

۳) حجم **۱۰۰** میکرولیتر کونژوگه بیوتینی به تمامی چاهک‌ها اضافه نمایید. پلیت را ۳۰- ۲۰ ثانیه به‌آرامی روی سطح میز تکان دهید.

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

۵) محتویات چاهک‌ها را در روش دستی با وارونه کردن پلیت و در روش دستگاهی با آسپیره کردن کاملا تخلیه نمایید.

۶) چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده‌سازی محلول‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

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

۸) پلیت را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید سپس محتویات چاهک‌ها را گر روش دستی با وارونه کردن پلیت و در روش دستگاهی با آسپیره کردن کاملا تخلیه نمایید.

۹) چاهک‌ها را مطابق با بند ۶ شستشو دهید.

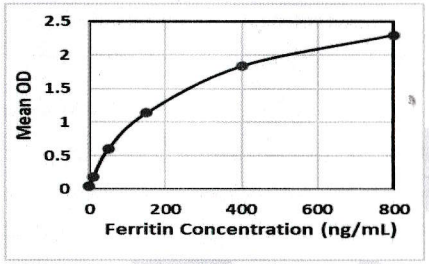
۱۰) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترای آماده شده (به بخش آماده‌سازی محلول‌ها مراجعه شود) به چاهک‌ها اضافه نمایید و با برچسب پلیت بپوشانید. سپس پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری فرمایید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، زمان انکوباسیون محلول سوبسترا را به‌مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۱۱) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به چاهک‌ها اضافه نموده و به مدت ۲۰-۱۵ ثانیه به‌آرامی تکان دهید.

۱۲) جذب نوری چاهک‌ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از روش Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید. از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrators	Well Number	Abs	Mean Abs	Conc. (ng/mL)
Cal. A	A1	0.042	0.044	0
	B1	0.046		
Cal. B	C1	0.186	0.180	10
	D1	0.175		
Cal. C	E1	0.596	0.600	50
	F1	0.604		
Cal. D	G1	1.16	1.14	150
	H1	1.12		
Cal. E	A2	1.832	1.838	400
	B2	1.845		
Cal. F	C2	2.311	2.299	800
	D2	2.288		



نکته: جذب نوری به‌دست آمده از کالیبراتورها و همچنین منحنی مربوطه فقط به‌عنوان مثال ذکر شده و در هر آزمایشگاهی در هر مرتبه آزمایش باید منحنی جدیدی ترسیم گردد.

مقادیر مورد انتظار

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به‌قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر برای آنالیت مورد نظر باید 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

Intra – Assay

دقت درون تستی با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

Serum Sample	1	2	3
No.of Repeats	20	20	20
Mean Ferritin (ng/mL)	6.37	15.51	127.12
SD (ng/mL)	0.35	0.62	5.01
CV (%)	5.5	4	3.9

Inter – Assay

دقت بین‌تستی با ارزیابی نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با غلظت‌های متفاوت در چهار نوبت کاری (هر نوبت پنج بار تکرار) بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

Serum Sample	1	2	3
No.of Repeats	20	20	20
Mean Ferritin (ng/mL)	4.99	10.34	131.59
SD (ng/mL)	0.29	0.47	5.52
CV (%)	5.8	4.5	4.1

Recovery

در این تست دو نمونه سرم به‌نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به‌عنوان یک نمونه، مقدار فریتین در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش Bias<10% است.

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	% Rec
1	4.62	121.11	62.86	63.11	100.3
2	11.33	5.27	8.3	8.02	96.6
3	131.64	12.17	71.90	69.81	97.1

Linearity

در این تست، غلظت فریتین در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای 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	6.12	-1.6	-2.2	1.9	2.3
2	54.12	2.2	-1.9	-2.1	3.6
3	97.42	-2.8	-3.4	-2.3	-1.5

Cross Reactivity

اختصاصیت این آزمایش با اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مداخله‌گر به سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین دوز ماده مداخله‌گر به دوز فریتین مورد نیاز برای همان مقدار جذب ارزیابی شد.

Substance	Cross Reactivity
Liver Ferritin	100%
Spleen Ferritin	100%
Human Heart Ferritin	<1.0%
Hemoglobin	<0.1%

Sensitivity

بر اساس جمع میانگین جذب نوری کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف معیار حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت ۰/۲ ng/mL می باشد.

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.

منابع

1. Beamish MR et al, "Transferrin iron, chelatable iron and ferritin in idiopathic hemochromatosis", *Br Jour Haematology,* **27,** 219 (1974).
2. Grace ND, Powel LW,"Iron storage disorders of the liver", *Gastroenterology,* **67,** 1257 (1974).
3. Anonymous, "Adult screening for anemia and hemoglobinopathies", *Nurse Prac,* **20,** 48-51(1995).
4. Corti MC, Gaziano M., Hennekens CH, Iron status and risk of cardio-vascular disease", *Ann Epidemiol,7,* 62-68 (1997) .
5. Edwards CQ., Kushnar JP, "Screening for hemachromatosis" , *NEJM,* **32,** 1616-19 (1993).
6. Jonxix JHP, Visser HKA,"Determination of low percentage of fetal hemoglobin in the blood of normal children" *Am J Dis.Child,* **92,** 588-98 (1956).
7. Jouanolle AM, David V, LeGall JY,"Genetic Hemochromatosis", *Ann Biol Clin (Paris),* **55,** 189-193 (1997).
8. Little D, "Hemochromatosis; Diagnosis and Management", *Am Fam Physician,* **53,** 2623-2658 (1996).
9. Morikawa K., Oseko F, Morikawa S, "A role for ferritin in hemopoiesis and the immune system", *Leukemia Lymphoma* **18,** 429-433. (1995)
10. Naimark BJ., Reddy AE., Sawasky JA,"Serum Ferritin and Heart Disease: The effect of moderate exercise on iron storage in postmenopausal women", *Can J Cardiol,* **12,** 1253-1257 (1996).

در صورت بروز هرگونه مشکل با بخش پشتیبانی شرکت تینا پژوهان آروین تماس حاصل فرمایید.

IVD

DIAPLUS
شرکت تینا پژوهان اروین
سهروردی شمالی ، پایین تر از آپادانا،
کوچه فیروزه، پلاک ۳ واحد ۱ و ۲
تلفن: ۰۲۱-۴۱۷۹۶۰۰۰

WWW.TINAPAJOOHAN.COM