www.padyabteb.com

Ferritin

Anemia ELISA Kits

REF: PT-EFR-401

IVD

مقدمه

مولکول فریتین از ۲۴ زنجیره پروتئینی تشکیل شده است که وزن مولکولی هر زنجیره D ۲۰۰۰۰ اســت. وظیفه اولیه فریتین ذخیره کردن آهن در بافت‌های بدن است که از همین طریق سلول‌ها را از اثرات سمی آهن غیر متصل محافظت می‌کند. فریتین با غلظت بالا در کبد، طحال و مغز استخوان وجود دارد. در بخش مرکزی ساختمان کروی هر مولکول فریتیــن ۴۵۰۰– ۳۰۰۰ اتم آهن فریک (Fe^{3+}) وجــود دارد که تقریبــا ۲۰ درصد آهن بدن را تشــکیل می‌دهند. مقدار کمی فریتین در سرم وجود دارد که رابطه مستقیمی با ذخایر بافتی فریتین دارد. لذا از اندازه گیری فریتین ســرم برای تعیین ذخایر آهن بدن استفاده می‌شود.

غلظت سرمی فریتین بازتابی از تغییرات ایجاد شده در مقدار آهن به علت سن و جنس است. اندازه گیری فریتین سرم در تشخیص کمبــود و زیادی آهن بدن اهمیت دارد و از آن برای تشــخیص کم خونی فقر آهن از ســایر کم خونی با علل مختلف استفاده می‌شود. در موارد طبیعی مقدار متوســط در زمان تولد بالاســت، که بتدریج در زمــان طفولیــت کاهش پیدا می‌کند تا اینکــه در زمان بلوغ یک افزایش پیشرونده در ذخیره آهن در جنس مذکر دیده می‌شود که باعث بالا رفتن فریتین می‌شــود. در جنس مونث در سنین باروری ســطح فریتین کاهش پیدا می‌کند، که این حالت تا زمان یائســگی وجود دارد، بعد از آن سطح فریتین سرم افزایش پیدا می‌کند.

افزایش فریتین ســرم در هموکروماتوز ارثی و سایر شرایط تجمع آهن نظیر تالاسمی ها رخ می‌دهد. افزایش ملایم فریتین در شرایط التهاب حاد ناشــی از عفونت، جراحت یــا تومور و بیماری‌های کبدی مشاهده می‌شود.

اساس روش اندازه‌گیری

این تســت به کمک آنتــی بــادی مونوکلونال اختصاصــی به روش ساندویچی طراحی شده است.

بدین گونه که یک آنتی بادی مونوکلونال Anti-Ferritin برای تثبیت بر روی فاز جامد و یک آنتی بادی Anti-Ferritin برای کونژوگاسیون با آنزیم (HRP) مورد استفاده قرار گرفته است.

با افــزودن نمونه ســرم مولکــول Ferritin با آنتــی بادی‌های فوق واکنــش داده و بین آنتی بادی متصل بر روی فاز جامد و آنتی بادی کونژوگه با آنزیم ساندویچ می‌گردد.

پــس ازگذشــت زمــان انکوباســیون (۴۵ دقیقه) در دمــای اتاق و شستشــو چاهک‌ها توسط محلول شستشــو دهنده و اضافه کردن محلول سوبســترا و محلول رنگزا و انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه رنگ آبی ظاهر می‌گردد. با اضافه کردن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شــود. شدت رنگ در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری می‌گردد.

شدت رنگ رابطه مستقیم با غلظت Ferritin در نمونه دارد.

محتویات کیت

ردیف	نام محصول	حجم/ تعداد
1	پلیت پوشانده شده با آنتی بادی مونوکلونال Anti-Ferritin (Anti Ferritin Coated plate)	1X96 test
2	محلول آنزیم کونژوگه آماده مصرف (Ferritin Enzyme conjugate)	2X12 ml
3	استاندارد در غلظت 0.0 ng/ml (Cal Ferri. 0.0ng/ml)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 10 ng/ml (Cal Ferri. 10 ng/ml)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 50 ng/ml (Cal Ferri. 10 ng/ml)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 100 ng/ml (Cal Ferri. 100ng/ml)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 250 ng/ml (Cal Ferri. 250 ng/ml)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 500 ng/ml (Cal Ferri. 500ng/ml)	1X0.5 ml
	استاندارد در غلظت 1000 ng/ml (Cal Ferri. 1000 ng/ml)	1X0.5 ml
4	بافر شستشوی غلیظ 20X (Wash Buffer)	1X30ml
5	محلول سوبسترا – رنگزا آماده مصرف (Chrom Substrte)	1X11ml
6	محلول متوقف کننده (اسیدکلریدریک یک نرمال) (Stop Solution)	1X6ml
7	سرم کنترل به همراه نگهدارنده (Control serum)	2X0.5 ml
8	برچسب مخصوص پلیت	۱ عدد

+ محلول شستشو، رنگزا و متوقف کننده در همه کیت‌ها مشترک می‌باشند.

+ اســتانداردها در بافــر حاوی نگهدارنده هســتند کــه در مقابل استاندارد کبدی IRP 80/602WHO کالیبره شده‌اند.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند

1- سمپلرهای ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری

2- آب مقطر

3- دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری به عنوان فیلتر رفرانس

4- کاغذ جاذب رطوبت

نگهداری کیت

1- کیت در یخچال در دمای ۸-۲ °c نگهداری شود.

2- میکروپلیت‌ها باید در کیسه در بسته به همراه نمگیر نگهداری شود.

3- مدت زمان پایداری کیت تا پایان تاریخ انقضا (یکسال از زمان تولید) نوشته شده برروی برچسب کیت می‌باشد.

4- کیت باز شده حداقل به مدت ۲ ماه در دمای ۸-۲ °c پایدار خواهد بود.

5- محلول شستشوی رقیق شده به نسبت ۱ به ۲۰ به مدت یک هفته در دمای ۸-۲ °c قابل نگهداری و مصرف می‌باشد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه

پس از جداسازی سرم از نمونه خون بیمار، نمونه را می‌توان به مدت ۴۸ ساعت در درمای ۸-۲ °c نگهداری شوند. جهت نگهداری طولانی‌تر، نمونه‌ها باید در دمای ۲۰ °c- نگهداری شوند. نمونه‌های ذوب شده باید قبل از آزمایش مخلوط شوند. بهتر است ترجیحاً از نمونه‌های با کدورت بالا، همولیز و لیپمیک استفاده نشود. در ضمن باید از فریز و ذوب مکرر نمونه‌ها (Freeze-Thaw) اجتناب گردد.

نکات قابل توجه

1- کیت فقط جهت استفاده در آزمایشگاه تشخیصی کاربرد دارد.

2- استفاده از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه جهت دقت و صحت بیشتر.

3- شستشو چاهک‌ها به صورت کامل جهت نتیجه بهتر.

- بررسی چاهک‌ها از نظر وجود حباب.
- خارج کردن حباب از چاهک‌ها با زدن ضربه آهسته به پلیت.

4- عدم ترکیب اجزاء کیت با سری ساخت متفاوت.

5- جلوگیری از تعویض درب معرف‌ها.

6- جلوگیری از تماس معرف به ویژه معرف حاوی اسیدکلریدریک با پوست (در صورت تماس با آب کافی شستشو داده شود).

7- از استعمال دخانیات، خوردن و آشامیدن اجتناب شود.

8- از پی‌پت کردن مواد با دهان پرهیز شود.

9- از دستکش و کلاه مناسب استفاده شود.

+ جهت ساخت برخی از اجزای این کیت از سرم انسانی که از نظر HCV، HbsAg، HIV منفی می‌باشد، استفاده شده است.

آماده سازی معرف‌ها

1- همه معرف‌ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (۲۵-۱۸ درجه سانتی گراد) برسند.

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

نکته‌های مهم

1- توصیه می‌شود که بیشتر از ۳۲ چاهک در هر ران کاری استفاده نشود. اگر پی‌پت به صورت دستی انجام می گیرد، پی‌پت کردن همه استانداردها، نمونه‌ها، کنترل‌ها باید در ۵ دقیقه تمام شود. برای پی‌پت کردن کل پلیت ۹۶ تستی باید دستگاه اتوماتیک استفاده شود.

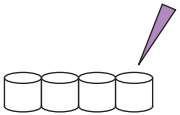
2- فرایند شستشو خیلی مهم است. شستشوی ناکافی باعث کاهش دقت و افزایش کاذب جذب می‌شود.

3- در مواردی که مقدار Ferritin نمونه بیش از 1000ng/ml باشد، نمونه را با استاندارد صفر رقیق و سپس آزمایش را تکرار کنید.

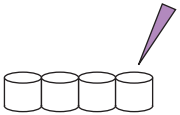
روش انجام آزمایش

1- انتخاب تعدادچاهک‌های کوت شده برای استانداردها، کنترل و نمونه‌های بیمار بصورت دوتایی و قراردادن مابقی چاهک‌ها در کیسه مخصوص به همراه نمگیر و بستن درب آن.

2- ۲۰µl استانداردها، کنترل و نمونه‌ها به چاهک‌ها اضافه نمایید.



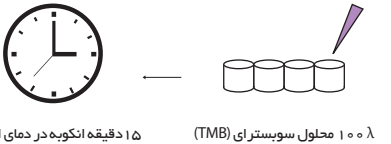
3- ۲۰۰µl آنزیم کونژوگه HRP به تمام چاهک‌ها اضافه نمایید.



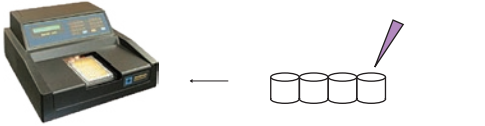
4- پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید و سپس درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید .

5- محتویات چاهک‌ها را خالی کنید و چاهک‌هارا ۵ بار با ۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشوی آماده شستشو دهید. سپس چاهک‌ها را وارونه کنید و همراه با تکان دادن خالی کنید و در انتهای شستشو با ضربات ملایم بر روی کاغذ جاذب تمامی مایع موجود در چاهک‌ها را تخلیه نمایید.

6- ۱۰۰µl از سوبسترای آماده مصرف به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید.



7- ۵۰ µl از محلول متوقف کننده به همه چاهک‌ها اضافه کنید. سپس جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت کنید (در صورت امکان از طول موج ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید). سنجش جذب نوری باید حداکثر تا ۱۵ دقیقه پس از انجام آزمایش انجام شود.



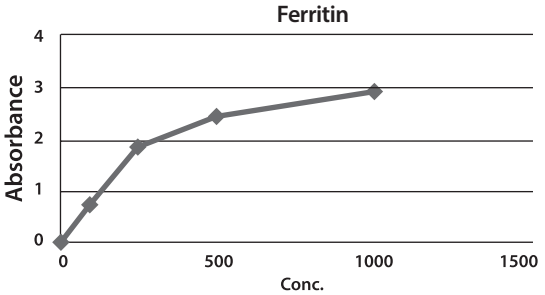
محاسبه نتایج

1- با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) برروی کاغذ میلی‌متری، منحنی استانداردی رسم کنید.

2- 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.

راهنمای محاسبه

مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل تنها به عنوان راهنمایی آورده شده است و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید بدست آورد.



ردیف	مقدار استاندارد (ng/ml)	جذب نوری
۱	۰	۰/۰۲۵
۲	۱۰	۰/۰۸۲
۳	۵۰	۰/۳۵
۴	۱۰۰	۰/۷۱
۵	۲۵۰	۱/۸۳
۶	۵۰۰	۲/۴
۷	۱۰۰۰	۲/۹

مقادیر طبیعی

بدلیل اختلافات سنی، نژادی و رژیم تغذیه، نمی‌توان برای تمام جمعیت‌ها محدوده مرجع تعیین کرد. بنابراین هر آزمایشگاه باید محدوده مرجع خود را گزارش نماید. مقادیر طبیعی در سرم افراد نرمال که توسط آزمایشات مکرر به روش الایزا بدست آمده است به قرار زیر می‌باشد:

مردان بالغ	۲۰–۲۵۰ ng/ml
زنان بالغ	۱۰–۱۲۰ng/ml
کودکان ۶ ماه الی ۱۵ سال	۷–۱۴۰ ng/ml
نوزاد ۲–۵ ماه	۵۰–۲۰۰ ng/ml
نوزاد ۱ ماهه	۲۰۰–۶۰۰ ng/ml
نوزاد بدو تولد	۲۵–۲۰۰ ng/ml

خصوصیات کیت

1- حساسیت آنالیتیکال (حد تشخیص) :

برای تعیین حد تشخیص ۲۰ مرتبه استاندارد صفر آزمایش شد. حد تشخیص از ۲ انحراف معیار (SD) بالاتر از میانگین جذب در غلظت صفر بدست آمد. حد تشخیص برای این کیت ۲ ng/ml بدست آمد.

2- دقت:

برای محاسبه میزان دقت در یک روز (درون سنجی) و روزهای مختلف، (میان سنجی) آزمایش بر روی ۳ نمونه سرم ۲۰ بار تکرار شد که ضریب تغییرات به شرح ذیل است.

دقت درون سنجی				
نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
۱	۲۰	۸/۲۷	۰/۷۲	۸/۷۷
۲	۲۰	۷۷/۶۶	۴/۶۲	۵/۹۵
۳	۲۰	۵۸۶	۲۴/۴۳	۴/۱۷

دقت میان سنجی				
نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
۱	۲۰	۸/۵	۱/۰۹	۱۲/۸۶
۲	۲۰	۷۸/۷	۵/۳۴	۶/۷۷
۳	۲۰	۵۸۹	۲۸/۵۶	۴/۸۴

3- ویژگی:

واکنش متقاطع آنتی بادی های مونوکلونال مورد استفاده در این آزمایش برای آلبومین سرم انسان، آلفا فیتوپروتئین و ترانسفرین انسانی به ترتیب ۰/۰۸، ۰/۱۳، ۰/۰۶ درصد بدست آمد.

نوع ماده	غلظت	درصد تداخل (%)
آلبومین سرم انسانی	500 µg/ml	۰/۰۸
آلفافیتوپروتئین	500 µg/ml	۰/۱۳
ترانسفرین انسانی	500 µg/ml	۰/۰۶

4- خطی بودن:

سه نمونه مختلف سرمی با استاندارد صفر به نسبت های ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۸ رقیق شدند. سپس غلظت Ferritin در آنها با استفاده از کیت محاسبه شد که نتایج ذیل بدست آمد.

نمونه سرمی	غلظت اولیه (ng/ml)	درصد خطی بودن		
		۱:۲	۱:۴	۱:۸
۱	۱۵۰/۷	۱۰۵	۱۰۸	۱۰۷
۲	۳۲۵/۴	۹۸	۱۰۲	۱۰۴
۳	۸۲۱/۲	۹۹	۱۰۱	۱۰۶

5- اثر هوک:

در این کیت، اثر هوک تا غلظت ۵۰۰۰ ng/ml دیده نشد.

+ References

1. Ronald H, et al Clin. Chem 29/6, 1109 -1113 (1983)
2. Van Oost, S.A. et al Clin. Chem, 28/12, 2429 –2433 (1982)
3. Watanabe, N. et al Clin. Chem.,25/1 , 80 – 82 (1979)
4. Walter G.O., et al J. Clin. Path . 29 770 - 772 (1973)
5. کتاب جامع الایزا – دکتر ناصر ملک نیا

پاره‌ای نکات علمی در خصوص رفع مشکلات احتمالی در کیت‌های الایزا :

	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	• دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید. • 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	• PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. • پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	• پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه‌کنید. • پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.

	طول موج خوانش نامناسب (۴۰۵ نانومتر بجای ۴۵۰ نانومتر)	• تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. • طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
عدم تولید رنگ در چاهک‌ها	استفاده از مواد سایر کیت‌ها	تکرار تست با مواد همان کیت
	انجام نشدن مرحله‌ای از تست	تکرار تست
	آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید	تکرار تست با محلول کونژوگه‌جدید
صحیح نبودن نمودار	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده‌کنید

صحیح نبودن نمودار	پی‌پتینگ نامناسب	• استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف. • از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده‌کنید. • توجه کنید نوک سمپلر محکم به‌سمپلر متصل باشد. • توجه کنید در هنگام پی‌پتینگ حباب وارد نوک سمپلرنشود.
	PH نامناسب و یا غلظت بالای، Wash Buffer	PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید.
	شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها	پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید.

بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD	آلودگی استاندارد صفر	تکرار تست با استانداردهای جدید
	آلودگی محلول رنگزا	استفاده از محلول رنگزا جدید
	آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نا مناسب	• عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. • تمام سوزن‌های دستگاه واشر را چک کنید.
	طول موج نامناسب در خوانش	• تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. • طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. • از فیلتر ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس استفاده‌کنید.

	آلودگی محلول Stop	تکرار تست با محلول Stop جدید
	ایجاد وقفه در خوانش	بلافاصله بعد از Stop کردن تست، یا حداکثر تا ۱۵ دقیقه پلیت را بخوانید.
عدم تکرار پذیری مناسب	پی‌پتینگ نا مناسب	• استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف • از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید. • توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. • توجه کنید در هنگام پی‌پتینگ حباب وارد نشود. • توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد. • کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلرها.

عدم تکرار پذیری مناسب	طولانی شدن زمان انجام تست	فاصله زمانی بین اضافه کردن استانداردها و نمونه نباید بیشتر از ۱۰ دقیقه باشد. در این صورت نتایج قابل اعتماد نیست.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	• پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. • پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.
	باقی ماندن کونژوگه در لبه چاهک‌ها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها.	پی‌پتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	وجود حباب در چاهک‌ها	در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک‌ها نباشد.
	کثیف بودن کف چاهک‌ها	کف چاهکها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید
	مخلوط نشدن محلول‌های کیت	قبل از استفاده از ویال محلول‌ها را به آرامی تکان دهید

خلاصه روش آزمایش

معرف‌ها	استانداردها	نمونه‌ها
استانداردها	۲۰µl	–
نمونه‌ها	–	۲۰µl
کونژوگه	۲۰۰µl	۲۰۰µl

در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه نمایید.

۵ بار با ۳۵۰µl محلول بافرشستشو رقیق شستشو دهید و با دقت محتویات را خالی کنید.

محلول رنگزا	۱۰۰ µl	۱۰۰ µl

به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی انکوبه نمایید.

محلول متوقف کننده	۵۰ µl	۵۰ µl

جـذب نوری هر چاهـک در طول موج ۴۵۰ nm و فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm قرائت شود.

www.padyabteb.com

PADYABTEB
Producer of Diagnostic Products

دفتر فروش و خدمات پس از فروش:

تهران . ۲۴ متری سعادت آباد . خیابان یکم شرقی . خیابان شب بو شرقی . پلاک ۱۷
طبقه دوم . واحد ۸ **تلفن:** ۴۲۰۸۷۳۰۰ (۰۲۱) **خدمات پس از فروش:** ۰۹۱۲۹۴۰۹۱۲۴

کارخانه:

شهرک صنعتی اشتهارد . بلوار ابوریحان بیرونی . بلوار غزالی غربی . خیابان لادن ۲
تلفن: ۸ ـ ۳۷۷۷۵۵۳۱ (۰۲۶) **فکس:** ۳۷۷۷۵۵۲۹ (۰۲۶)

ISO 13485

eztest
ELISA Kits