

## کیت تعیین مقدار کلپروتکتین (Calprotectin) به روش الایزا

بیماری‌های التهابی روده (Inflammatory Bowel Diseases: IBD) یکی از اختلالات سیستم گوارشی است که میلیون‌ها انسان را در سراسر جهان مبتلا کرده است. بیماری‌های کرون و کولیت اولسراتیو دو نوع اصلی بیماری‌های التهابی روده می‌باشند. این بیماری‌ها به عنوان یک مشکل بهداشتی عمومی مطرح بوده و به عوارض بسیار برای بیمار و صرف هزینه منجر می‌گردد. علاوه بر این، به نظر می‌رسد که التهاب روده‌ای به واسطه IBD زمینه ساز بروز بدخیمی در کلون می‌شود. از طرفی سندروم روده تحریک پذیر (Irritable Bowel syndrome: IBS) نوعی اختلال در عملکرد روده است که با درد مزمن در ناحیه شکم، احساس ناراحتی، نفخ و تغییرات در عادات روده‌ای، بدون علت خاصی، مشخص می‌شود. از آنجایی که هر دو اختلال با علائم مشابه بروز می‌کنند، بنابراین افتراق این اختلالات برای انتخاب مسیر درمانی از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. تشخیص قطعی بیماری‌های التهابی روده بر اساس فرآیندهای اندوسکوپی و رادیولوژیک امکان پذیر است. بنابراین پزشک ناچار است تا برای اخذ تصمیم درست در جهت درمان بیمار از روش‌های تهاجمی پیچیده بهره‌گیری نماید. طی سال‌های گذشته تلاش‌های گسترده‌ای از سوی بسیاری از پژوهشگران در راستای معرفی بیومارکری جهت تشخیص غیرتهاجمی این بیماری صورت گرفته است و کلپروتکتین یکی از بیومارکرهایی است که در این زمینه مطرح می‌باشد. این بیومارکر در واقع یک پروتئین ۳۶ کیلو دالتونی است که به وسیله گرانولوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و سلول‌های اپی تلیال سنگفرشی (به غیر از سلول‌های موجود در پوست نرمال) تولید می‌شود. این پروتئین با خاصیت مهار بر روی باکتری‌ها و قارچ‌ها جزئی از سیستم ایمنی ذاتی به شمار می‌رود. با توجه به ایجاد صدمه بافتی در مخاط روده در بیماری‌های التهابی روده، منجر به لکوسیتوز و رهاسازی محتویات این سلول‌ها در لومن روده می‌شود و همچنین به دلیل آنکه بیش از ۶۰ درصد پروتئین‌های سیتوزولی گرانولوسیت‌ها و ماکروفاژها از کلپروتکتین تشکیل یافته است، از این پروتئین به عنوان مارکر تشخیصی التهاب روده استفاده می‌شود.

### اساسی آزمایش :

برای انجام این تست، کلپروتکتین موجود در نمونه مدفوع با استفاده از یک بافر با فرمولاسیون اختصاصی طی پروسه‌ای استخراج شده، میزان کلپروتکتین موجود در نمونه استخراج شده با روش الایزای اختصاصی اندازه‌گیری می‌شود.

آزمایش الایزای طراحی شده در این کیت، ساندریج الایزا می‌باشد. در این روش نمونه‌های استخراج شده به همراه استانداردهای موجود در چاهک‌های الایزا که با آنتی بادی‌های منوکلونال ضد کلپروتکتین پوشش داده شده‌اند، مجاور می‌شوند. پس از طی زمان انکوباسیون و شستشو، آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد کلپروتکتین و کونژوگه با آنزیم HRP به چاهک‌ها اضافه می‌شود. بعد از گذشت زمان انکوباسیون، متناسب با غلظت کلپروتکتین در هر چاهک، کمپلکس ایمنی شکل می‌گیرد. پس از شستشو، محلول رنگزا که حاوی هیدروژن پراکسید ( $H_2O_2$ ) و کروموزن است، به چاهک‌ها افزوده می‌شود که رنگ آبی پدید آمده با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهک‌ها متناسب است. با افزودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شود که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد.

### محتویات کیت :

- ۱) پلیت حاوی چاهک‌های پوشش داده شده با آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد کلپروتکتین (Anti-Calprotectin Coated Plate).
- ۲) بافر استخراج : دو ویال حاوی بافر استخراج از نمونه (آماده مصرف) .
- ۳) محلول رقیق کننده نمونه : یک ویال حاوی بافر رقیق کننده نمونه استخراج شده (آماده مصرف) .
- ۴) محلول آنزیم کونژوگه (Anti-Calprotectin Conjugated Enzyme) : یک ویال حاوی محلول کونژوگه (آماده مصرف) .
- ۵) سری استانداردها (Standards Set) : شامل ۶ ویال استاندارد با غلظت‌های معادل صفر، ۲۵، ۵۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم کلپروتکتین در هر گرم مدفوع.
- ۶) نمونه‌های کنترل (پایین و بالا) : دو ویال، هر یک حاوی نمونه کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال .
- ۷) محلول رنگزای یک مرحله‌ای (Chromogen-Substrate) : یک ویال حاوی محلول سوبسترا-رنگزا.
- ۸) محلول شستشو : یک ویال حاوی محلول شستشوی غلیظ (20X)، جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید.
- ۹) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال حاوی اسید کلریدریک ۱ نرمال .
- ۱۰) برچسب مخصوص پلیت .



شرکت دانش بنیان  
**پیش‌تاز**  
اسپتال‌ها  
اسپتال‌ها

## مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند :

- دستگاه الیزاریدر با طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس)
- دستگاه شیکر
- سمپلرهای ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر دقیق
- آب مقطر
- ترازوی دیجیتال
- سانتریفیوژ با حداقل RCF=3000xg
- تیوب استخراج نمونه

## نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

- محتویات این کیت برای مصرف در همین کیت طراحی شده است.
- از مخلوط کردن محتویات کیت‌ها با شماره ساخت‌های مختلف جداً خودداری نمایید.
- نمونه بیماران، استانداردها، کنترل‌ها و چاهک‌های استفاده شده، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند. تمامی محلول‌های واکنش گر و معرف‌ها باید مطابق با مقررات ملی دفع پسماندهای عفونی امحا شوند.

## شرایط نگهداری :

- کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.
- چاهک‌ها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید.
- پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آن‌ها می‌باشد.
- محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و مصرف می‌باشد.

## جمع آوری و آماده سازی نمونه:

- نمونه مدفوع پس از جمع آوری باید در یخچال نگهداری شده و در اولین زمان ممکن (حداکثر طی ۴ روز) استخراج کلپروتکتین به انجام رسد.
- از قرارگیری نمونه در معرض دمای بالاتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد باید اجتناب شود.
- در صورتی که امکان انجام استخراج در دوره زمانی کمتر از ۴ روز وجود نداشته باشد، لازم است تا نمونه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و پیش از انجام استخراج به دمای محیط برسد. لازم به ذکر است که انجماد نمونه، به دلیل آزاد شدن کلپروتکتین از گرانولوسیت‌های موجود در مدفوع، در برخی موارد می‌تواند به افزایش مقدار این پروتئین بیانجامد.
- نمونه استخراج شده را می‌توان به مدت حداکثر ۵ روز در یخچال نگهداری نمود. در صورت نیاز به زمان بیشتر، نمونه استخراج شده را می‌توان در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری نمود.
- پیش از انجام استخراج لازم است تا نمونه با استفاده از یک اسپاچولای چوبی به خوبی هموژنیزه شود.

## فرآیند استخراج کلپروتکتین از نمونه مدفوع:

برای این کار می‌توان از دو روش نمونه برداری وزنی و نمونه برداری تقریبی استفاده کرد. توصیه می‌گردد هر کجا که امکان استخراج نمونه با روش وزنی وجود دارد ترجیحاً از این روش استفاده شود.

## فرآیند استخراج نمونه با روش وزنی :

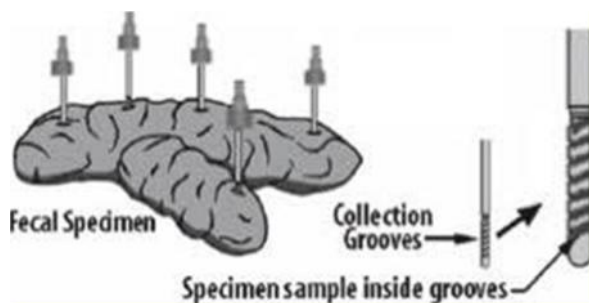
- ترازوی دیجیتال را با قرار دادن یک لوله آزمایش درب پیچ دار خالی به همراه لوپ نمونه گیری یک بار مصرف درون آن، روی صفر تنظیم نمایید (tare weight).
- بین ۲۰ تا ۴۰ میلی‌گرم از نمونه مدفوع هموژنیزه را با استفاده از لوپ نمونه‌گیری فوق برداشت نموده و در تیوب مربوطه قرار دهید. از برداشت مواد سفت و مواد غذایی هضم نشده خودداری کنید.
- لوپ را داخل تیوب قرار داده و وزن نمونه برداشت شده را تعیین نمایید.



- ۴) انتهای بالایی لوپ را بشکنید به نحوی که قسمت آغشته به نمونه در تیوب باقی مانده و امکان بستن درب لوله نیز فراهم باشد.
- ۵) بافر استخراج را به نسبت ۱ به ۵۰ به نمونه مدفوع اضافه نمایید. به عنوان مثال، در صورتی که وزن نمونه مدفوع موجود در تیوب ۴۰ میلی‌گرم باشد، لازم است تا ۴۹ برابر آن (۱۹۶۰ = ۴۹ × ۴۰) یعنی ۱۹۶۰ میکرولیتر بافر استخراج به تیوب مربوطه اضافه گردد.
- ۶) درب تیوب را بسته و محتویات آن را به مدت ۳۰ ثانیه به شدت ورتکس نمایید.
- ۷) با استفاده از شیکری با سرعت دوران حدود ۵۰۰ دور در دقیقه، اجازه دهید تا محتویات تیوب به مدت ۳۰ دقیقه به خوبی مخلوط گردند. (وجود لوپ داخل تیوب به مخلوط شدن بهتر محتویات کمک می‌کند).
- ۸) تیوب‌ها را به مدت ۳ دقیقه در 3000xg سانتریفیوژ نمایید.
- ۹) محلول رویی را به یک تیوب جدید منتقل کنید و رسوب را همانند سایر پسماندهای عفونی دور بریزید. نمونه استخراج شده را می‌توان به مدت حداکثر ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای مدت طولانی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد یا پایین‌تر نگهداری نمود.

### فرایند استخراج به روش استفاده از تیوب های مخصوص جمع آوری نمونه مدفوع (روش تقریبی)

- ۱) بعد از رسیدن دمای بافر استخراج داخل کیت و نمونه ها به دمای اتاق مقدار ۲ میلی لیتر از بافر را به داخل هر تیوب اضافه نمایید.
- ۲) لوپ اسپیرال برداشت نمونه واقع در درب تیوب را پنج مرتبه در جاهای مختلفی از نمونه مدفوع تا عمق ۵ میلی متر فرو ببرید و به مقدار حدودا ۴۰ میلی گرم (تقریباً به اندازه یک لپه) از مدفوعی که بصورت هموزن باشد را بوسیله لوپ اسپیرال نمونه گیری بردارید. لوپ را به داخل تیوب برده، درب آنرا محکم ببندید و آنرا به خوبی تکان دهید و یا ورتکس کنید به شکلی که نمونه برداشت شده کاملاً در بافر استخراج حل شود.



- توجه:** از برداشت مواد سفت و مواد غذایی هضم نشده و توده ای در نمونه مدفوع خودداری کنید.
- ۳) در صورتیکه نمونه مدفوع به صورت مایع باشد می بایست با سمپلر به مقدار ۴۰ میکرولیتر از آن را برداشته و با ۵۰ برابر آن یعنی حدود ۲ میلی لیتر از بافر استخراج مخلوط گردد. نسبت تقریبی وزن نمونه به بافر استخراج باید حدودا ۱ به ۵۰ باشد یعنی مقدار حدودا ۴۰ میلی گرم از مدفوع با حدود ۲ میلی لیتر از بافر استخراج مخلوط شود.
  - ۴) تیوب را بدون تکان دادن، به مدت ۵ دقیقه به صورت ساکن نگه دارید و از محلول رویی به عنوان نمونه استخراج شده استفاده کرده و رسوب را به عنوان پسماندهای عفونی دور بریزید. نمونه استخراج شده را می‌توان به مدت حداکثر ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای مدت طولانی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد یا پایین‌تر نگهداری نمود.
  - ۵) نمونه های مدفوع استخراج شده را با استفاده از بافر رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق نمایید، به عنوان مثال ۱۰ میکرولیتر از نمونه استخراج شده (سوپرناتانت) را با ۴۹۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده نمونه کاملاً مخلوط نمایید و با استفاده از این محلول تست را طبق پروشور داخل کیت به انجام رسانید.

### توضیحات عمومی:

- ۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به دمای اتاق برسانید.
- ۲) بهتر است به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند.
- ۳) از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید.
- ۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده، جذب نوری چاهک‌ها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می‌باشد.
- ۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهک‌ها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات، پس از شستشو از چاهک‌ها تخلیه شوند.
- ۶) در هنگام سمپلینگ تمام محلول‌ها و نمونه‌ها را وسط چاهک‌ها بریزید.



۷) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب زمان انکوباسیون مناسب می‌باشد، بنابراین پیشنهاد می‌گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلول‌های مورد نیاز را آماده نموده و درب محلول‌های مورد نیاز را باز کنید، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیقتر می‌شود.  
۸) به دلیل مشابه در بند ۷ بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه‌ها بیش از ۵ دقیقه به طول نیانجامد.

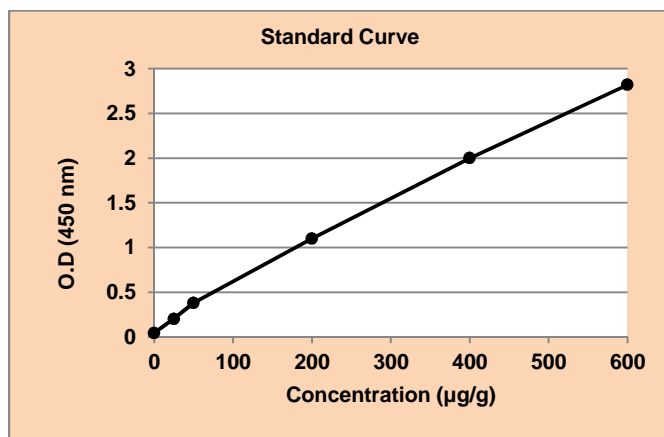
## مراحل انجام آزمایش :

- ۱) نمونه‌های مدفوع استخراج شده را با استفاده از بافر رقیق کننده نمونه، به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق نمایید. به عنوان مثال ۱۰ میکرولیتر از نمونه استخراج شده را با ۴۹۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده نمونه مخلوط کنید.
- ۲) تعداد چاهک‌های مورد نظر را انتخاب نموده و سایر چاهک‌ها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید.
- ۳) ۱۰۰ میکرولیتر از هر استاندارد، نمونه کنترل و نمونه‌های رقیق شده را داخل هر چاهک بریزید، پیشنهاد می‌گردد که از استانداردها و نمونه‌ها به صورت تکرار دوتایی استفاده شود. بدین معنی که هر استاندارد و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید.
- ۴) درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و میکروپلیت را به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر با سرعت حدود ۵۰۰ دور در دقیقه و در دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) قرار دهید. پیشنهاد می‌شود جهت جلوگیری از ایجاد نوسانات دمایی در طی انکوباسیون، از انکوباتور رومیزی مجهز به شیکر استفاده گردد.
- ۵) محتویات چاهک‌ها را خالی کرده و هر چاهک را ۵ مرتبه با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید، (برای شستشو می‌توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می‌تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد، در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک‌ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو میکروپلیت را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند.
- ۶) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کوئزوگه (Anti-Calprotectin Conjugated Enzyme) را به هر چاهک اضافه نمایید.
- ۷) درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و میکروپلیت را به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر با سرعت حدود ۵۰۰ دور در دقیقه و در دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) قرار دهید .
- ۸) محتویات چاهک‌ها را خالی کرده و هر چاهک را ۵ مرتبه با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید. (همانند بند ۵)
- ۹) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen - Substrate) به هر چاهک اضافه نمایید.
- ۱۰) چاهک‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی قرار دهید .
- ۱۱) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک، ادامه واکنش‌های آنزیمی را متوقف نمایید.
- ۱۲) برای سنجش جذب نوری از دستگاه الیزاریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده کنید (توصیه می‌شود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد).

## محاسبه نتایج :

- از هر دستگاه الیزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm می‌توان استفاده نمود.
- ۱) جذب نوری استانداردها و نمونه‌ها را به کمک دستگاه الیزاریدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید.
  - ۲) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آن‌ها یک نمودار point to point رسم کنید، به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آن‌ها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد به دست آورید، سپس نقاط به دست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی حاصل شود.
  - ۳) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را به دست آورده و روی محور عمودی جای آن را پیدا کنید، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید به طوری که این خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و بعد از محل تلاقی خط و منحنی، خطی عمود بر محور افقی وارد کنید. نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد.

استانداردها (µg/g)	جذب نوری
۰	۰/۰۴۳
۲۵	۰/۲۰
۵۰	۰/۳۸
۲۰۰	۱/۱۰
۴۰۰	۲/۰۰
۶۰۰	۲/۸۲



**توجه:** جذب های نوری و منحنی ارائه شده، فقط به عنوان نمونه بوده و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

### تفسیر نتایج:

مقادیر کلپروتکتین در مدفوع که توسط تست‌های مکرر به روش الایزا به دست آمده به قرار زیر می‌باشد ولی پیشنهاد می‌گردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را به دست آورد:

غلظت	تفسیر
کمتر از ۵۰ میکروگرم در گرم	محدوده نرمال، در مورد این بیماران برای تعیین عامل التهاب، احتمالاً نیازی به بررسی بیشتر با روش‌های تهاجمی وجود ندارند.
مقادیر بین ۵۰ تا ۲۰۰ میکروگرم در گرم	این محدوده نشان دهنده بیماری ملایم یا فاز بهبود IBD می‌باشد.
بیش از ۲۰۰ میکروگرم در گرم	بیماری فعال همراه با التهاب در دستگاه گوارشی، در مورد این بیماران انجام بررسی‌های بیشتر توسط پزشک پیشنهاد می‌گردد.

### محدودیت های کیت:

- تشخیص نایستی صرفاً بر اساس نتایج حاصل از کیت انجام شود و می‌بایست به علائم بالینی و تاریخچه بیمار نیز توجه نمود.
- در مواردی که از این کیت جهت پیگیری درمان بیماری و بررسی تغییر میزان کلپروتکتین مدفوعی استفاده می‌شود. می‌بایست صرفاً از روش استخراج وزنی برای نمونه مدفوع استفاده نمود.
- مثبت شدن کلپروتکتین در مدفوع نمی‌تواند به تنهایی دال بر تشخیص IBD باشد.
- در بیماران IBD فرم فعال و غیر فعال بیماری در نوسان است در نتیجه نتایج کلپروتکتین ممکن است دچار نوسان گردد.
- خونریزی مجاری گوارشی به میزان بیشتر از ۱۰۰ میلی لیتر در روز، غلظت کلپروتکتین در مدفوع را به اندازه ۱۵ µg/g افزایش خواهد داد.
- سایر بیماری‌های روده ای از جمله عفونت های دستگاه گوارش و سرطان روده بزرگ می‌تواند منجر به افزایش غلظت Calprotectin شود.

### شاخص‌های اجرایی:

#### (۱) حداقل مقدار قابل اندازه‌گیری:

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت Calprotectin قابل تشخیص در این کیت ۵ میکروگرم در گرم می‌باشد.



## ۲) دقت آزمایش :

آزمایشهای اینترا - اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و اینتر- اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایشات مختلف) با استفاده از ۳ نمونه مدفوع با مقادیر مختلف Calprotectin انجام گردید که در جداول ۱ و ۲ آمده است :

### جدول شماره ۱ (اینتر- اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (µg/g)	SD	CV (%)
۱	۱۰	۲۰/۹	۲/۵	۱۱/۹
۲	۱۰	۱۸۹/۶	۶/۹	۳/۶
۳	۱۰	۵۱۱/۱	۱۹/۷	۳/۸

### جدول شماره ۲ (اینتر- اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (µg/g)	SD	CV (%)
۱	۲۰	۲۶/۰	۵/۱	۱۹/۶
۲	۲۰	۱۷۳/۷	۱۷/۳	۹/۹
۳	۲۰	۴۰۴/۲	۴۹/۹	۱۲/۳

هر سری آزمایش بصورت Duplicate انجام شده است.

## ۳) ریکاوری آزمایش :

مقادیر معلومی از Calprotectin به ۳ نمونه استخراج شده از مدفوع با غلظت‌های مشخص Calprotectin افزوده شد و ریکاوری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول زیر آمده است:

### جدول ریکاوری :

نمونه	مقدار Calprotectin موجود در نمونه (µg/g)	مقدار افزوده شده (µg/g)	مقدار مورد انتظار (µg/g)	مقدار به دست آمده (µg/g)	ریکاوری (%)
۱	۴۵/۸	۱۸۲/۵	۱۱۴/۲	۱۲۲/۳	۱۰۷
۱	۴۵/۸	۲۰۷/۳	۱۲۶/۷	۱۱۴/۲	۹۰
۲	۵۶/۲	۱۸۲/۵	۱۱۹/۴	۱۲۲/۱	۱۰۲
۲	۵۶/۲	۲۰۷/۳	۱۳۱/۸	۱۲۴/۹	۹۵
۳	۲۸۹/۷	۱۸۲/۵	۲۳۶/۱	۲۳۴/۱	۹۹
۳	۲۸۹/۷	۲۰۷/۳	۲۴۸/۵	۲۴۳/۰	۹۸

## ۴) خطی بودن آزمایش :

به کمک بافر استخراج رقت‌های متوالی از یک نمونه استخراج شده با غلظت مشخص از Calprotectin تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت محاسبه شد، نتایج مربوطه در جدول مشاهده می‌گردد.



ریکاوری (%)			مقدار calprotectin موجود در نمونه رقیق نشده (µg/g)	نمونه
رقت ۱/۸	رقت ۱/۴	رقت ۱/۲		
۱۰۶	۱۰۵	۱۰۳	۱۸۹	۱

## ۵) تداخلات دارویی:

هیچ گونه اثر تداخلی با داروهایی که به طور شایع مورد مصرف قرار می‌گیرند، شامل سولفاسالازین، استامینوفن، آموکسی سیلین، پردنیزولون و آزاتیوپرین مشاهده نگردید.

### References :

Viennois E, Zhao Y, Merlin D. Biomarkers of inflammatory bowel disease: from classical laboratory tools to personalized medicine. Inflammatory bowel diseases. 2015 May 11;21(10):2467-74.  
Yui S, Nakatani Y, Mikami M. Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2003;26(6):753-60.  
Hessian PA, Fisher L. The heterodimeric complex of MRP-8 (S100A8) and MRP-14 (S100A9). The FEBS Journal. 2001 Jan 1;268(2):353-63.

## روش انجام آزمایش Calprotectin به صورت شماتیک

چاهک‌های کوت شده با آنتی بادی ضد Calprotectin			
رقیق سازی نمونه استخراج شده با نسبت ۱ به ۵۰ با بافر رقیق کننده نمونه			
محلول‌ها	استانداردها	نمونه کنترل	نمونه رقیق شده
استانداردها	۱۰۰ میکرولیتر	-	-
نمونه کنترل	-	۱۰۰ میکرولیتر	-
نمونه رقیق شده	-	-	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بیوشانید و آن را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق بر روی شیکر با سرعت دوران حدود ۵۰۰ دور در دقیقه قرار دهید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهک‌ها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهک‌ها را بشویید.			
محلول کوئزوگه	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بیوشانید و آن را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق بر روی شیکر با سرعت دوران حدود ۵۰۰ دور در دقیقه قرار دهید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهک‌ها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهک‌ها را بشویید.			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار دهید .			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهک‌ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر فرانس) قرائت کنید.			

### جدول محتویات کیت

فرمت ۹۶ تستی	فرمت ۴۸ تستی	محتویات کیت
1 x 96 Wells	1 x 48 Wells	پلیت Plate
1x50 ml	1x25 ml	محلول رقیق کننده نمونه Sample Diluent
2x100 ml	2x50 ml	محلول بافر استخراج Extraction Buffer
1x12 ml	1x6 ml	محلول کونژوگه Conjugate
St. 6x1 ml	St. 6x0.5 ml	سری استانداردها Standards Set
2x1 ml	2x0.5 ml	سرم کنترل Control Sera
1x50 ml	1x25 ml	محلول شستشو Wash Solution
1x12 ml	1x6 ml	محلول متوقف کننده Stop Solution
1x12 ml	1x6 ml	محلول رنگزای یک مرحله ای Chromogen - Substrate
1	1	برچسب مخصوص پلیت Cardboard Sealer