IVD-REF: PS - Ferr	پیشگامان سنجش پیشگام در سنجش و نوآوری	کیت الایزا فریتین
Ver. No: 04		Ferritin ELISA KIT

معرف	48 تستی	96 تستی	192 تستی	آماده سازی
پلیت پوشیده شده با استرپتاویدین	1×48 wells	1×96 wells	2×96 wells	آماده مصرف
کالیبراتور 1-7 (0، 10، 50، 100، 250، 500 و 1000 نانوگرم در میلی لیتر) در بافر، به همراه نگهدارنده با قابلیت ردیابی نسبت به ماده مرجع WHO IRP 80/602	7 ×0.5 mL	7 ×0.5 mL	7 ×1.0 mL	آماده مصرف
نمونه های کنترل در بافر سازگار با سرم انسانی همراه با نگهدارنده(بازه قابل قبول سرم کنترل برروی برچسب قید شده است)	2 ×0.5 mL	2 ×0.5 mL	2 ×1.0 mL	آماده مصرف
کونژوگه (قرمز رنگ)	1 ×12.0 mL	2 ×12.0 mL	4 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول شستشو غلیظ 20X	1 ×30 mL	1 ×30 mL	1 ×50 mL	به نسبت 1 به 20 با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید
محلول سوبسترا-رنگ زا (تترا متیل بنزیدین و آب اکسیژنه)	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	2 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول توقف(اسید کلریدریک 1 مولار)	1 ×6.0 mL	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف

کاربرد

کیت الایزای فریتین شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس 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 48 کیلودالتون به نام آپوفریتین است که از هستهٔ هیدروکسی فسفات آهن که تا 4000 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 24 زیرواحد با وزن مولکولی 2000 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 10 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 فقرآهن 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 15 نانوگرم در میلی لیتر بر وجود آنمی 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 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 هپاتیت 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 ایساتیس 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 15 دقیقه رنگ آبی بوجود می آید. با افزودن محلول متوقف گر، واکنش آنزیمی متوقف می گردد و در نهایت شدت جذب نوری در 450 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

1. سمپلرهای 20، 50 ، 100 و 200 میکرولیتری دقیق. سمپلر 8 کاناله با قابلیت پیپتینگ 50 تا 200 میکرولیتر و یا دیسپنسر اتوماتیک، اگرچه ضروری نیست ولی باعث بهبود قابل توجه تکرارپذیری و صحت نتایج می گردد.
2. آب مقطر با هدایت کمتر از 1 µS/cm

3. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر 450 نانومتری و در صورت امکان 630 نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.
4. کاغذ رطوبت گیر
5. دستگاه واشر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر 8 کاناله یا سرنگ که قادر به ریختن 350 میکرولیتر محلول شست وشو باشد.

نگهداری کیت

1. کیت پس از تحویل باید در دمای 8-2 درجه سانتی گراد (یخچال) نگهداری شود. کلیه معرف ها و اجزاء کیت تا تاریخ انقضاء مندرج برروی جعبه کیت به شرط نگهداری در دمای یاد شده پایدار هستند. ***هرگز فراتر از تاریخ انقضاء مندرج برروی جعبه از کیت استفاده نکنید.***
2. 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.
3. از انجماد کیت یا اجزاء کیت خودداری نمایید.
4. 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.
5. محلول شستشو باید روزانه و تازه تهیه شود و در همان روز تهیه مصرف شود.
6. تغییر در خصوصیات فیزیکی معرف ها نظیر وجود ذرات معلق در آنها اغلب حاکی از آلودگی و خرابی معرف ها می باشد.
7. محلول سوبسترا-رنگ زا باید بی رنگ باشد. وجود رنگ آبی در این محلول نشان از خرابی و آلودگی آن دارد و باید دور ریخته شود.
8. کیت های باز شده اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شوند، حداکثر به مدت 8 هفته پایدار خواهند بود.

9. اجزاء کیت ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابجایی درب معرف ها جلوگیری شود.
10. استفاده از سر سمپلر یکبار مصرف برای دقت و صحت و پرهیز از آلودگی برای برداشتن نمونه ها استانداردها و کنترل ها ضروری است.

جمع آوری و آماده سازی نمونه

1. سرم یا پلاسمای EDTA نمونه مناسب برای این آزمایش است.
2. از نمونه های با کدورت بالا، همولیز یا لیپمیک ترجیحا استفاده نشود.
3. در صورتی که انجام آزمایش در همان روز جمع آوری نمونه امکان پذیر نباشد، نمونه ها را می توان برای مدت 48 ساعت در دمای 2 تا 8 درجه سانتیگراد نگه داری کرد. برای مدت طولانی تر نمونه ها باید در دمای 20 °C- سانتیگراد نگهداری شود.
4. از ذوب و انجماد مکرر نمونه ها اجتناب شود. نمونه های منجمد باید قبل از آزمایش به آرامی، اما به طور کامل مخلوط شده تا کاملاً یکنواخت و همگن گردد.

احتیاطات و هشدارها

1. کیت فقط برای تشخیص طبی آزمایشگاهی کاربرد دارد.
2. کلیه معرف های کیت برای سنجش مستقیم فریتین سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده اند و برای سنجش فریتین سایر مایعات بیولوژیک یا پلاسمای غیر EDTA مناسب نمی باشد.
3. قبل از آغاز سنجش، دستورالعمل پیش رو را به دقت مطالعه نموده و اطمینان حاصل کنید که تمامی نکات آن را به خوبی فرا گرفته اید. همواره از ویرایش معتبر و به روز دستورالعمل که درون کیت موجود می باشد، استفاده کنید.
4. کلیه جوانب ایمنی دراجرای آزمایش رعایت شود. برای آگاهی از احتیاطات لازم به "راهنمای اصول کلی حفاظت و پیشگیری از آلودگی کارکنان و محیط آزمایشگاه (روش های صحیح میکروب شناسی

وتکنیک های صحیح آزمایشگاهی)" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش 1393 مراجعه نمایید.

5. 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.

6. با کلیه نمونه های بیمار به عنوان نمونه های بالقوه عفونی برخورد نمایید.

7. 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.

8. 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 آزایدهای 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 1394 مراجعه نمایید.

آماده سازی معرف ها:

1. همه معرف ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (27-20درجه سانتیگراد) برسند.

2. تهیه محلول شستشو: برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با 19 حجم آب مقطر رقیق نمائید.

نکات مهم در انجام تست:

1. فرایند شستشو از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. شستشوی ناکافی باعث عدم جدا شدن پیوندهای غیر اختصاصی و جذب نوری زمینه (Background) می گردد.

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

3. در مواردی که مقدار فریتین نمونه بیش از 1000ng/mLباشد، نمونه را با استاندارد صفر کیت رقیق و سپس آزمایش را تکرار نموده و ضریب رقت را در محاسبه نهایی منظور نمایید.
4. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده و به خوبی مخلوط شده باشند.
5. دمای مطلوب محیط آزمایشگاه برای آزمایش های الایزا 20 تا25 درجه سانتیگراد می باشد.
6. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش به خوبی مخلوط نمایید.
7. بهتراست 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.
8. جهت پیپت کردن محلول سوبسترا-رنگ زا و محلول متوقف گر از میکروپیپت های حاوی قطعات فلزی استفاده نکنید.
9. از تغییر در هریک از مراحل انجام آزمایش نظیر دفعات شستشو یا زمان انکوباسیون خودداری نمایید. حداکثر دامنه قابل قبول زمان انکوباسیون ٪5± می باشد.
10. 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 از5 دقیقه به طول بیانجامد) خطای قابل توجهی از ناحیه اختلاف زمانی بین ریختن اولین نمونه و آخرین نمونه رخ نمی دهد. با این وجود پیپتینگ چاهک ها با محلول کونژوگه نباید بیشتر از 5 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.
11. در هر بار انجام آزمایش منحنی کالیبراسیون را مجدد ترسیم نموده و برای محاسبه نتایج از منحنی ذخیره شده استفاده نکنید.
12. مراحل آزمایش را بدون وقفه انجام دهید. وقفه بین مراحل باعث نتایج کاذب می گردد.

13. 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.

14. هر نوع نمونه یا ماده کنترلی که حاوی سدیم آزاید یا تیومرسال باشد، با این کیت سازگار نبوده و آزمایش برروی آنها ممکن است به حصول پاسخ های کاذب بیانجامد.

روش انجام آزمایش:

1- تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار را بصورت 2 تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده نمگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.

2- 20 میکرولیتر از استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار به داخل هر چاهک بریزید.

3- 200 میکرولیتر از محلول کونژوگه ، به تمام چاهک ها اضافه کنید.

4- پلیت را بمدت 15 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 45 دقیقه در دمای اتاق(20-27°C) انکوبه کنید.

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

- . برای شستشوی چاهک ها، ابتدا 350 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 5 بار) تکرار کنید. در انتهای شستشو، با ضربه زدن ملایم پلیت بر روی کاغذ جاذب رطوبت، تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.
- بهتر است برای شستشو از دستگاه های اتوماتیک واشر که قابل برنامه ریزی است استفاده نمایید. که در این صورت به دستورالعمل دستگاه شستشو مراجعه نمایید.

6- 100 میکرولیتر از سوبسترا-رنگ زا آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را بمدت 15 دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

7- 50 میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همان ترتیبی که محلول سوبسترا رنگ زا را اضافه نمودید، به همه چاهک ها اضافه کنید. سپس حداکثر ظرف مدت 10 دقیقه جذب نوری هر چاهک را در طول موج 450 نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول موج 630 نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید).

محاسبه نتایج:

1. با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها برروی محور عمودی (محور Y) و غلظت مشخص آنها برروی محور افقی(محور X) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد را از طریق ترسیم خطوطی که از تمامی نقاط تلاقی عبور کرده باشد، ترسیم 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.
3. 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.
4.

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.

Row	ng/mL	OD
1	**0**	**0.03**
2	**10**	**0.08**
3	**50**	**0.35**
4	**100**	**0.65**
5	**250**	**1.25**
6	**500**	**1.80**
7	**1000**	**2.53**

کنترل کیفی:

در هر کیت یک نمونه کنترل وجود دارد که مقادیر مورد انتظار برای آن برروی 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 برروی تعدادی افرادی سالم دامنه مرجع زیر براساس درون یابی دامنه بین ٪2/5 و ٪97/5 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 درصورت مشاهده نا همخوانی، بازه مرجع خود را بدست آورد.

گروه سنی	2.5^{th}-97.5^{th} percentile
نوزادان4 تا 15 روز	25–200
نوزادان15 روز تا 6 ماه	200–600
اطفال 6 ماه تا یک سال	8/4– 182
کودکان 1 تا 3 سال	5/3 –100
کودکان 3 تا 5 سال	11– 86
پسران 6 تا 16 سال	16–107
مردان بالغ	20–250
دختران 6 تا 24 سال	10–82
زنان 25 تا 49 سال	7–147
زنان 50 تا 79 سال	6–363

خصوصیات اجرایی کیت

1- 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 95 ام (95^{th} percentile) از60 بار اندازه گیری برروی نمونه شاهد(استاندارد صفر) طی چندین ران بدست آمد. حد بلانک معادل غلظتی درنظر گرفته شده که 95٪ از60 نتیجه اندازه گیری های تکراری ، مقداری کمتر از آن بدست آمده است . حد شاهد به روش فوق معادل0.15 ng/mL بدست آمد. برای تعیین حد آشکار سازی 20 اندازه گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم(n=20×3=60) با محتوای فریتین کمتر از4.0 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.

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

2- دقت(Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت فریتین شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس و 3 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 10 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(2×3×3×10). 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

3-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 فتو 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 10 درصد تغییر نکند، تهیه گردید . سپس مقدار فریتین همزمان در یک ران در نمونه هایی که با ماتریکس بی اثرspike شده 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:

$$\%\mathbf{cross-reactivity} = \frac{\boldsymbol{mean\ conc.\ of\ spiked\ sample - mean\ conc.\ of\ unspiked\ sample}}{\boldsymbol{spiked\ conc.}} \times \mathbf{100}$$

همچنین ارزیابی درصد تداخل از ناحیه مداخله گرهای معمول آزمایش های بیوشیمیایی انجام و مشخص گردید، که هموگلوبین تا 50 میلیگرم در میلی لیتر ، بیلیروبین غیرکونژوگه تا 20 میلیگرم در دسی لیتر و تری گلیسریدها تا 1000 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**

4- خطی بودن(Linearity):

به منظور ارزیابی خطی بودن یک نمونه با غلظت اولیه813 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:

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.

5- درستی(Trueness):

5-1- 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 10 درصد تغییر نکند افزوده شد. و سپس بررسی توانمندی سیستم اندازه گیری درتشخیص مقدار افزوده شده از طریق رابطه زیر محاسبه گردید:

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

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

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

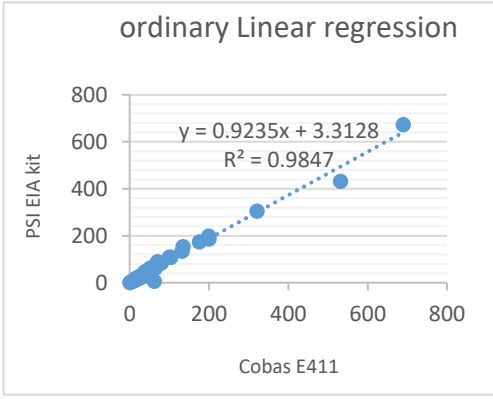
نتایج این ارزیابی در جدول زیر خلاصه شده است:

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%

5-2- 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:

$$\boldsymbol{PS\ EIA = 0.9235 CLIA + 3.3128}$$
$$\boldsymbol{r = 0.9923}$$
$$\boldsymbol{r^2 = 0.9847}$$



6- 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.

خطا یابی 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	1.دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید. 2.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	PH.1 آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. 2.پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	1.پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. 2.پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.
	طول موج خوانش نامناسب (405 nm بجای 450nm)	1.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. 2.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید.

صحیح نبودن نمودار استانداردها	پیپتینگ نامناسب	1.استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف 2.از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید. 3.توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. 4.توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود.
	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	1 . PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. 2.پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD	آلودگی استاندارد صفر	تکرار تست با استاندارد های جدید
	آلودگی محلول رنگزا	استفاده از محلول رنگزا جدید
	آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نامناسب	1.عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. 2. تمام سوزن های دستگاه واشر را چک کنید.
	طول موج نامناسب در خوانش	1.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. 2.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. 3.از فیلتر 630 نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید.
	آلودگی محلول Stop	تکرار تست با محلول Stop جدید

عدم تولید رنگ در چاهک ها	استفاده از مواد سایر کیت ها	تکرار تست با مواد همان کیت
	انجام نشدن مرحله ای از تست	تکرار تست
	آلودگی محلول رنگزا	تکرار تست با محلول رنگزا جدید
	آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید	تکرار تست با محلول کونژوگه جدید
عدم تکرار پذیری مناسب	پیپتینگ نامناسب، گرفتگی لوله داخلی سمپلر بواسطه آلودگی	1.استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف 2.از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید 3.توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. 4.توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نشود. 5.توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد. 6.کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلر ها
	طولانی شدن زمان انجام تست	فاصله زمانی بین اضافه کردن استاندارد ها و نمونه نباید بیشتر از 10 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.

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