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

معرف	۴۸ تستی	۹۶ تستی	۱۹۲ تستی	آماده سازی
پلیت پوشیده شده با استرپتاویدین	1×48 wells	1×96 wells	2×96 wells	آماده مصرف
کالیبراتور۱–۷ (۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ 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 ۱ به ۲۰ 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 ۱ 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 ۴۸ کیلودالتون به نام آپوفریتین است که از هستهٔ هیدروکسی فسفات آهن که تا ۴۰۰۰ 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 ۲۴ زیرواحد با وزن مولکولی ۲۰۰۰ 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 ۱۰ 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 ۱۵ 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 ۱۵ دقیقه رنگ آبی بوجود می آید. با افزودن محلول متوقف گر، واکنش آنزیمی متوقف می گردد و در نهایت شدت جذب نوری در ۴۵۰ 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

۱. سمپلرهای ۲۰، ۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتری دقیق. سمپلر ۸ کاناله با قابلیت پیپتینگ ۵۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر و یا دیسپنسر اتوماتیک، اگرچه ضروری نیست ولی باعث بهبود قابل توجه تکرارپذیری و صحت نتایج می گردد.

۲. آب مقطر با هدایت کمتر از 1 µS/cm

۳. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.
۴. کاغذ رطوبت گیر
۵. دستگاه واشر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر ۸ کاناله یا سرنگ که قادر به ریختن ۳۵۰ میکرولیتر محلول شست وشو باشد.

نگهداری کیت

۱. کیت پس از تحویل باید در دمای ۸-۲ 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.***
۲. 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.
۳. از انجماد کیت یا اجزاء کیت خودداری نمایید.
۴. 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.
۵. محلول شستشو باید روزانه و تازه تهیه شود و در همان روز تهیه مصرف شود.
۶. تغییر در خصوصیات فیزیکی معرف ها نظیر وجود ذرات معلق در آنها اغلب حاکی از آلودگی و خرابی معرف ها می باشد.
۷. 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.
۸. کیت های باز شده اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شوند، حداکثر به مدت ۸ هفته پایدار خواهند بود.

۹. اجزاء کیت ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابجایی درب معرف ها جلوگیری شود.

۱۰. 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

۱. سرم یا پلاسمای EDTA نمونه مناسب برای این آزمایش است.

۲. از نمونه های با کدورت بالا، همولیز یا لیپمیک ترجیحا استفاده نشود.

۳. در صورتی که انجام آزمایش در همان روز جمع آوری نمونه امکان پذیر نباشد، نمونه ها را می توان برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگه داری کرد. برای مدت طولانی تر نمونه ها باید در دمای ۲۰ °C- سانتیگراد نگهداری شود.

۴. 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

۱. کیت فقط برای تشخیص طبی آزمایشگاهی کاربرد دارد.

۲. 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.

۳. 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.

۴. 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 ۱۳۹۳ مراجعه نمایید.

۵. 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.

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

۷. 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.

۸. 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 ۱۳۹۴ مراجعه نمایید.

آماده سازی معرف ها:

۱. همه معرف ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (۲۷-۲۰درجه سانتیگراد) برسند.

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

نکات مهم در انجام تست:

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

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

۳. در مواردی که مقدار فریتین نمونه بیش از ۱۰۰۰ng/mLباشد، نمونه را با استاندارد صفر کیت رقیق و سپس آزمایش را تکرار نموده و ضریب رقت را در محاسبه نهایی منظور نمایید.
۴. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده و به خوبی مخلوط شده باشند.
۵. دمای مطلوب محیط آزمایشگاه برای آزمایش های الایزا ۲۰ تا۲۵ درجه سانتیگراد می باشد.
۶. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش به خوبی مخلوط نمایید.
۷. 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.
۸. جهت پیپت کردن محلول سوبسترا-رنگ زا و محلول متوقف گر از میکروپیپت های حاوی قطعات فلزی استفاده نکنید.
۹. از تغییر در هریک از مراحل انجام آزمایش نظیر دفعات شستشو یا زمان انکوباسیون خودداری نمایید. حداکثر دامنه قابل قبول زمان انکوباسیون ٪۵± می باشد.
۱۰. 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 از۵ 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 ۵ 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.
۱۱. در هر بار انجام آزمایش منحنی کالیبراسیون را مجدد ترسیم نموده و برای محاسبه نتایج از منحنی ذخیره شده استفاده نکنید.
۱۲. مراحل آزمایش را بدون وقفه انجام دهید. وقفه بین مراحل باعث نتایج کاذب می گردد.

۱۳. 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.

۱۴. 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:

۱- تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده نمگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.

۲- ۲۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار به داخل هر چاهک بریزید.

۳- ۲۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه ، به تمام چاهک ها اضافه کنید.

۴- پلیت را بمدت ۱۵ 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 ۴۵ دقیقه در دمای اتاق($۲۰-۲۷^{o}C$) انکوبه کنید.

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

- . برای شستشوی چاهک ها، ابتدا ۳۵۰ 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 ۵ 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.

۶- ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترا-رنگ زا آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

۷- ۵۰ 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 ۱۰ دقیقه جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول موج ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید).

محاسبه نتایج:

۱. 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.

۲. 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.

۳. 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.

۴.

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 ٪۲/۵ و ٪۹۷/۵ 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
نوزادان۴ تا ۱۵ روز	۲۵-۲۰۰
نوزادان۱۵ روز تا ۶ ماه	۲۰۰-۶۰۰
اطفال ۶ ماه تا یک سال	۸/۴- ۱۸۲
کودکان ۱ تا ۳ سال	۵/۳ -۱۰۰
کودکان ۳ تا ۵ سال	۱۱- ۸۶
پسران ۶ تا ۱۶ سال	۱۶-۱۰۷
مردان بالغ	۲۰-۲۵۰
دختران ۶ تا ۲۴ سال	۱۰-۸۲
زنان ۲۵ تا ۴۹ سال	۷-۱۴۷
زنان ۵۰ تا ۷۹ سال	۶-۳۶۳

خصوصیات اجرایی کیت

۱- 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 ۹۵ ام (95^{th} percentile) از۶۰ بار اندازه گیری برروی نمونه شاهد(استاندارد صفر) طی چندین ران بدست آمد. حد بلانک معادل غلظتی درنظر گرفته شده که ۹۵٪ از ۶۰ 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 ۲۰ اندازه گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم(۶۰=۳×۲۰=n) 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.

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

۲- دقت(Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت فریتین شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس و ۳ 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 ۱۰ 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(۲×۳×۳×۱۰). 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

۳-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 ۱۰ 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 ۵۰ میلیگرم در میلی لیتر ، بیلیروبین غیرکونژوگه تا ۲۰ میلیگرم در دسی لیتر و تری گلیسریدها تا ۱۰۰۰ 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**

٤- خطی بودن(Linearity):

به منظور ارزیابی خطی بودن یک نمونه با غلظت اولیه 813 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.

٥- درستی(Trueness):

٥-١- 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 ۱۰ 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:

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

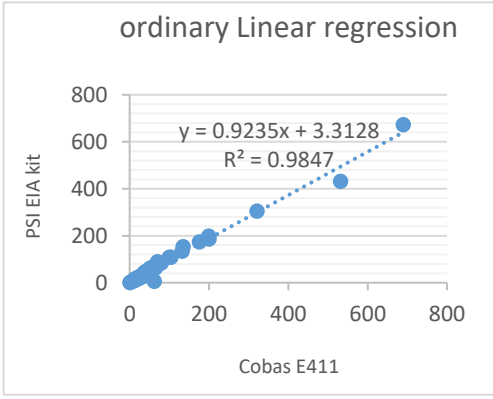
نتایج این ارزیابی در جدول زیر خلاصه شده است:

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%

۲-۵- 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:

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



٦- 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	۱.دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید. ۲.قبل از شروع آزمایش کیت و نمونه بیماران به دمای اتاق برسد.
	PH نامناسب و یا غلظت بالایWash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	۱.PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲.پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	۱.پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. ۲.پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.
	طول موج خوانش نامناسب (۴۰۵ nm بجای ۴۵۰nm)	۱.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. ۲.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید.

صحیح نبودن نمودار استانداردها	پیپتینگ نامناسب	۱.استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف ۲.از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید. ۳.توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. ۴.توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود.
	PH نامناسب و یا غلظت بالایWash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	۱ . PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲.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	۱.عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲ . تمام سوزن های دستگاه واشر را چک کنید.
	طول موج نامناسب در خوانش	۱.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. ۲.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. ۳.از فیلتر ۶۳۰ 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	۱.استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف ۲.از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید ۳.توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. ۴.توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نشود. ۵.توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد. ۶.کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلر ها
	طولانی شدن زمان انجام تست	فاصله زمانی بین اضافه کردن استاندارد ها 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.

	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.

Ferritin ELISA KIT		IVD-REF: PS - Ferr
		Ver. No: 02

INTENDED USE

For the quantitative determination of Ferritin concentration in human serum or plasma.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Ferritin is a soluble protein that along with insoluble hemosiderin are iron-storage proteins in human body. It consists of an approximately spherical apoprotein shell enclosing a core of ferric hydroxyphosphate which can accommodate up to 4000 iron atoms. Human Ferritin is made up from 24 subunits with molecular weight 2000 Dalton of two immunologically distinct types: H and L. The internal cavity of the Ferritin molecule communicates with the exterior via six channels, through which ferrous iron may enter to interact with a ferroxidase center on the Ferritin H subunit or leave after reduction, e.g. by dihydroflavins or ascorbic acid. Basic form of Ferritin is responsible for long-term iron-storage in liver, spleen and bone marrow. Acidic isoform is found in myocardium, placenta, tumor tissue and to a lesser extent in the depot organs. small amount of ferritin normally present in serum contains little iron and consists almost exclusively of L subunits. 1 ng/mL serum Ferritin corresponds to 8 mg total iron stores. And therefore serum Ferritin level measurement is the best, and most convenient laboratory test to estimate iron stores and diagnosis of iron deficiency and other Iron metabolisms disorders.

It has substituted the invasive and semiquantitative histochemical examination of bone marrow aspirate or biopsy as the gold standard for diagnosis of iron deficiency anemia.

Serum Ferritin measurement is a good indicator of iron storage in the body, but it does not reflect iron actually is available for erythropoiesis. Decrease in Ferritin below 15 ng/mL always indicates iron deficiency anemia and often occurs as a result of blood loss, decreased iron uptake, transferrin deficiency or increased iron demand (e.g. pregnancy). It is worthy to mention that, Ferritin is an acute phase reactant and can be increased in infections, acute and chronic inflammation, and malignant tumors; despite Iron deficiency. It also increases in viral and alcoholic hepatitis, chronic renal insufficiency without any relation to iron stores. Diagnosis should be done based on entire clinical finding of individual patients.

PRINICPLES OF THE METHOD

The PSI ferritin ELISA Kit is a solid-phase, non-competitive immunoassay based upon the direct sandwich technique. Calibrators, controls and patient samples are incubated in streptavidin coated microplate together with a biotinylated Anti- ferritin monoclonal antibody and an HRP-conjugated monoclonal antibody, both recognize ferritin from different sites. Ferritin present in calibrators/controls or samples is reacted with both antibodies to form a sandwich complex and also adsorbed to the streptavidin coated microstrips via the biotinylated Anti-ferritin Mab. The strips are then washed and, buffered substrate/chromogen reagent (hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine) is added to each well and the enzyme reaction is allowed to proceed. During the enzyme reaction a blue color will develop and the intensity of the color is directly proportional to the amount of FERRITIN present in the samples.

Ferritin ELISA KIT		IVD-REF: PS - Ferr
		Ver. No: 02

REAGENTS PROVIDED

Reagent	Quantity/48 Test KIT	Quantity/96 Test KIT	Quantity/192 Test KIT	Reconstitution
Microplate (96 breakable wells) coated with streptavidin	48 wells	96 wells	192 wells	Ready to Use
Calibrators 1-7 (0, 10, 50, 100, 250, 500 and 1000 ng/mL) in buffer, containing preservative with traceability to reference material "WHO IRP 80/602"	7 Vial/0.5 ml	7 Vial/0.5 ml	7 Vial/1.0 ml	Ready to Use
Control serum in buffer compatible with human serum matrix with preservatives	2 Vial/0.5 ml	2 Vial/0.5 ml	2 Vial/1.0 ml	Ready to Use
Enzyme Conjugate (red color)	1 Vial/12.0 ml	2 Vial/12.0 ml	4Vial/12 ml	Ready to use
Concentrated Wash solution	1 Vial/30ml	1 Vial/30 ml	1 Vial/50 ml	Dilute 20X with distilled water
Substrate-Chromogenic solution (Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide)	1 Vial/6.0ml	1 Vial/12ml	2 Vial/12ml	Ready to Use
Stop solution (H2So4 0.12M) Additional information about other additive is considered proprietary.	1 Vial/6.0 ml	1 Vial/6.0 ml	1 Vial/12.0 ml	Ready to Use

Materials required but not supplied with kit

The following materials are required but not provided in the kit:

- Distilled water with conductivity < 1µS/cm
- Precision micropipettes for delivery of,20, 50, 100, 200 microliters. An 8-channel pipette or respenser pipette with disposable plastic tips for delivery of 50-200 µL is useful but not essential. Pipettes for dispensing milliliter volumes.
- Vortex mixer
- Automatic washer or any other device which can deliver 350 microliter wash solution for microplates
- Microplate reader with a wavelength of 450 nm and 620-650 nm, and an absorbance range of 0-3.0

STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- If kept at 2-8 °C, before opening or reconstitution, all kit components are stable until the expiry date as indicated on the label on the outside of the kit box.
- Calibrator concentrations are displayed on vial labels and may vary between lots.
- Do not freeze kits.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the preparation day.
- Each lot of reagents and calibrators has been standardized to produce the correct reaction.

Do not interchange the reagents or calibrators between lots.

- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

Chromogenic solution TMB should be colorless. A blue color indicates that the reagent has been contaminated and should be discarded.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Human serum and EDTA plasma are samples of choice for PSI Ferritin kit.
- Do not use grossly haemolysed or turbid samples.
- If the measurement cannot be done within 24 hours after sample collection, samples should be kept at 2-8°C up to 48 hours. For longer storage serum or plasma must be stored at -20°C.
- Avoid repeated freeze and thaw cycles. Frozen specimens must be gently but thoroughly mixed after thawing.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

- For Professional in vitro diagnostic Use Only.
- All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of ferritin in human serum. The kit is not calibrated for the determination of ferritin in saliva, Non-EDTA plasma or other specimens of human or animal origin.
- Before starting the assay, read the working manual completely and carefully. Use the valid version of the instruction for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
- Please refer to the U.S. Department of Health and Human Services (Bethesda, Md., USA) publication No (CDC) 88—8_95 on laboratory safety procedures or any other local or national regulation.
- Handle all patient specimens as potentially infectious.
- Reagents contain sodium azide (NaN3) as a preservative. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. Follow local guidelines for disposal of all waste material.
- Avoid any skin contact with all reagents, stop solution contains strong acid. In case of contact, wash thoroughly with soap and water.

Caution

Material used in the preparation of human source reagents has been tested and found to be non-reactive for HIV 1 & 2 antibodies, HCV antibody and hepatitis B Surface Antigen (HBsAg). Since no method can completely rule out the presence of blood borne diseases, the handling and disposal of human source reagents from this product should be made as if they were potentially infectious.

Preparation of reagents

Wash Buffer:

According to volume required, pour the desired volume of wash concentrate into a clean container and dilute 20 fold by adding adequate volume of distilled or deionized water to give a buffered Wash Solution. E.g. 10 mL wash concentrate to 190 mL distilled water. Wash solution should be prepared daily and discard unused working wash solution at the end of the day.

HANDELING NOTES

1. Do not use the kit or components beyond expiry date.
2. Do not mix up vials caps.
3. Bring all the reagents to room temperature prior to use.
4. Thoroughly mix all reagents, calibrators/controls and samples by gentle agitation or swirling.
5. Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
6. Use a clean container and high-quality distilled or deionized water to prepare the working wash solution.
7. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of

each reagent and sample.

8. For the dispensing of Chromogenic solution and Stop solution avoid pipettes with metal parts.
9. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
10. Adhere the incubation times carefully. Tolerance limit of incubation time is ±5%
11. Although PSI ferritin EIA kit uses streptavidin coated plate technology and reaction does not proceed before adding conjugate solution, but to avoid drift, arising from low volume sample evaporation or incubation time difference between 1st and last well it is strongly recommended not to run more than 6 strips when pipetting manually (Time delay).
12. Perform all steps consecutively without any delay. Any delay in each step has deleterious effects on final results.
13. Draw a calibration curve for each run, do not use stored curve from previous runs.
14. Incubation with Chromogenic solution, must be done in dark.
15. Only standard 0 may be used to dilute any high serum samples. The use of any other reagent may lead to false results.
16. Opened reagents are stable maximally for 8 weeks if they are not contaminated, and stored in resealed original containers and handled as prescribed. Return to 2-8°C immediately after use

Measurement Procedure

1. Transfer the required number of microplate strips to a strip frame. (Immediately return the remaining strips to the aluminum pouch containing a desiccant and reseal carefully and store at 2-8°C.
2. Pipette 20 µL of each Calibrator (calibrators 0, 10, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/mL), controls and patient samples in duplicate into the appropriate wells.
3. Pipette 200 µL of enzyme conjugate into each well. Avoid carry-over by holding the pipette tip slightly above the top of the well and avoid touching the plastic strip or surface of the liquid.
4. Gently mix for 15 seconds
5. Cover the plate with an adhesive seal and incubate for 45 minutes at room temperature(20-27°C).
6. Wash the plate according to procedure below.
    a. Carefully dispense 350 µL of working wash solution into each well.
    b. Aspirate the content of each well.
    c. Repeat 4 additional wash for a total of 5 wash cycles.
    d. After the end of last wash cycle invert the plate and tap it carefully against an absorbent paper.

Note: In automatic strip washer, follow the manufacturer's instructions for maintenance and wash the required number of wash cycles.

7. Add 100 µL of Chromogenic solution TMB to each well using the same pipetting technique as in procedural note 3. The Chromogenic solution TMB should be added to the wells as quickly as possible.
8. Incubate for 15 min at room temperature preferentially in the dark.
9. Add 50 µL of Stop Solution, mix and read the absorbance at 450 nm (with a reference filter 620, 630, or 650) in a microplate spectrophotometer within 10 min after addition of Stop Solution.

Important Note: *always add stop solution in the same order as chromogenic solution TMB.*

CALCULATION OF RESULTS

1. Construct a calibration curve by plotting the average O.D. (450 nm) for each calibrator on the vertical (Y) axis against the concentration on the horizontal (X) axis, and draw a best fit curve through the

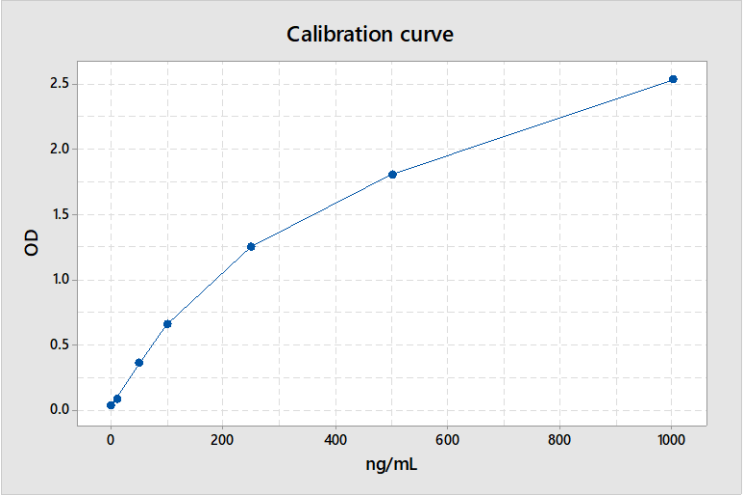
points on the graph.

2. To determine concentration of Ferritin in each sample, first locate the O.D. value on the Y-axis and extend a horizontal line to the calibration curve. At the point of intersection, draw a vertical line to the X-axis and read the corresponding concentration.
3. If a microplate spectrophotometer with built-in data calculation program is used, refer to the manual for the spectrophotometer and create a program using the concentration stated on the label of each of the Ferritin calibrators. For automatic calculation of Ferritin results it is recommended to use point-to-point method.

Typical Data

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real-time calibration curve.

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



Quality control

Ferritin control serums should be used for validation of the assay series. Ranges of expected results are indicated on the vial label. If assigned range are not obtained, a complete check of reagents and reader performance should be made and the assay shall be repeated. Each laboratory can also prepare its on serum pools at different levels, which can be used as internal controls in order to ensure the precision of the assay.

Expected values

A study with PSI ferritin EIA kit was performed using samples from some apparently healthy persons (ages 20-55) and also referring to some published scientific literature following reference interval corresponding to 2.5^{th} and 97.5^{th} percentiles of results was extrapolated. Each laboratory should first investigate the transferability of the recommended expected value to its own patient population and if it doesn't match, determine its own reference interval.:

Age groups	N	Reference interval (ng/mL)
Men: 20-55 y	**125**	20-250
Female: 20-55 y	**142**	10-120
Newborn	**-**	25-200
1 mo	**-**	20-600
2-5 mo	**-**	50-200
6 mo- 15 years	**-**	7-140

PERFORMANCE CRITERIA

1. Lower limit of measurement:

The Limit of Blank and Limit of Detection were determined according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A2 guideline.

In brief Limit of Blank was determined as the 95th percentile value from n = 60 measurements on standard 0 over several runs. The Limit of blank equals to the concentration that 95% of repeated measurements on zero standard give value below it. In the next step we determined standard deviation of repeated measurements on 3 samples with Ferritin contents less than 2.0 ng/mL determined from a separate method study (ECLIA Method). By adding the LOB calculated at 1st step to 1.645 times the greatest standards deviation calculated in the 2nd step($LOD = LOB + 1.645SD_L$) LOD calculated as 2.0 ng/mL.

2. Precision:

Precision was determined using PSI Ferritin kit reagents and three pooled human sera according to EP05-A3 Guideline.

Three runs per day (morning, midday and afternoon) by 3 user in 10 working days($10 \times 3 \times 3$). Results analyzed by fully nested ANOVA. Following results were obtained:

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. Specificity:

Specificity evaluation was performed according to guideline CLSI EP07-A2 to assess the cross-reactivity of the assay with human serum albumin, Alpha-fetoprotein and human transferrin. Samples containing cross-reactants was prepared by spiking natural human sera with material containing high levels of cross-reactants. Modification of serum matrix was no more than 10%. The % cross-reactivity was calculated for each sample using the equation below and normalized to the Ferritin content:

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

The results are summarized in the following table:

Cross-reactants	concentration	% Cross-reaction
Human serum albumin	500 µg/ml	**0.08**
Alpha- FP	500 µg/ml	**0.13**
Transferrin	500 µg/ml	**0.06**

Also interference evaluation from common sample abnormalities, hemolysis, Lipemia and icterus were performed according to aforementioned document and percentage interference was calculated for each sample using the equation below and normalized to the sample ferritin content.

$$\%interference = \frac{measured\ value - true\ value}{true\ value} \times 100\%$$

No interference were seen up to following listed concentration:

Interferent	source	Final concentration of interferent in test serum
Hemoglobin	Fresh haemolysed blood	**50 mg/mL**
Conjugated Bilirubin	Commercially crystalline Unconjugated Bilirubin	**20 mg/dL**
Triglycerides	Commercially Intralipid 10%	**1000 mg/dL**

4. Linearity

Evaluation of Linearity was performed according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP 06-A guideline

In brief a sample with concentration of 813 ng/mL Ferritin as a high sample was diluted with another sample with 12 ng/mL in different proportions and their ferritin, measured in duplicate on each dilution. Measured values compared with expected values which estimated by dilution formula, then % bias and %recovery calculated for each concentration and following results are obtained:

No	Ratio	Expected (ng/mL)	Rep 1 (ng/mLL)	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: Not applicable

5. Trueness:

5.1. Recovery Evaluation (Proportional error)

Recovery was assessed by adding 100 ng/mL of Ferritin to 5 samples with different ferritin contents. Then % recovery and % bias was calculated for each sample using the equations below:

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

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

The results are summarized in the following table:

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%

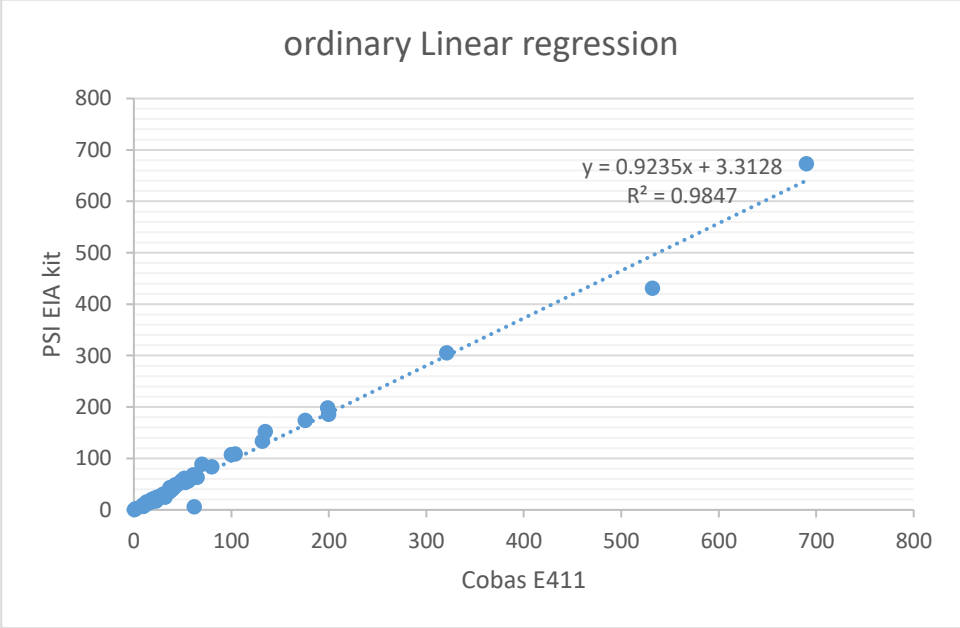
5.2. Method comparison:

A comparison of the PSI Ferritin ELISA kit (y axis) using patient samples (**n=88 range: 2.1-670 ng/mL**) with **ECLIA-Cobas E411-Roche diagnostic**)X axis) gave the following results by ordinary linear regression:

$$PSI\ \ EIA = 0.9235\ \ CLIA + 3.3128$$

$$r = 0.9923$$

$$r^2 = 0.9847$$



6. High dose hook effect

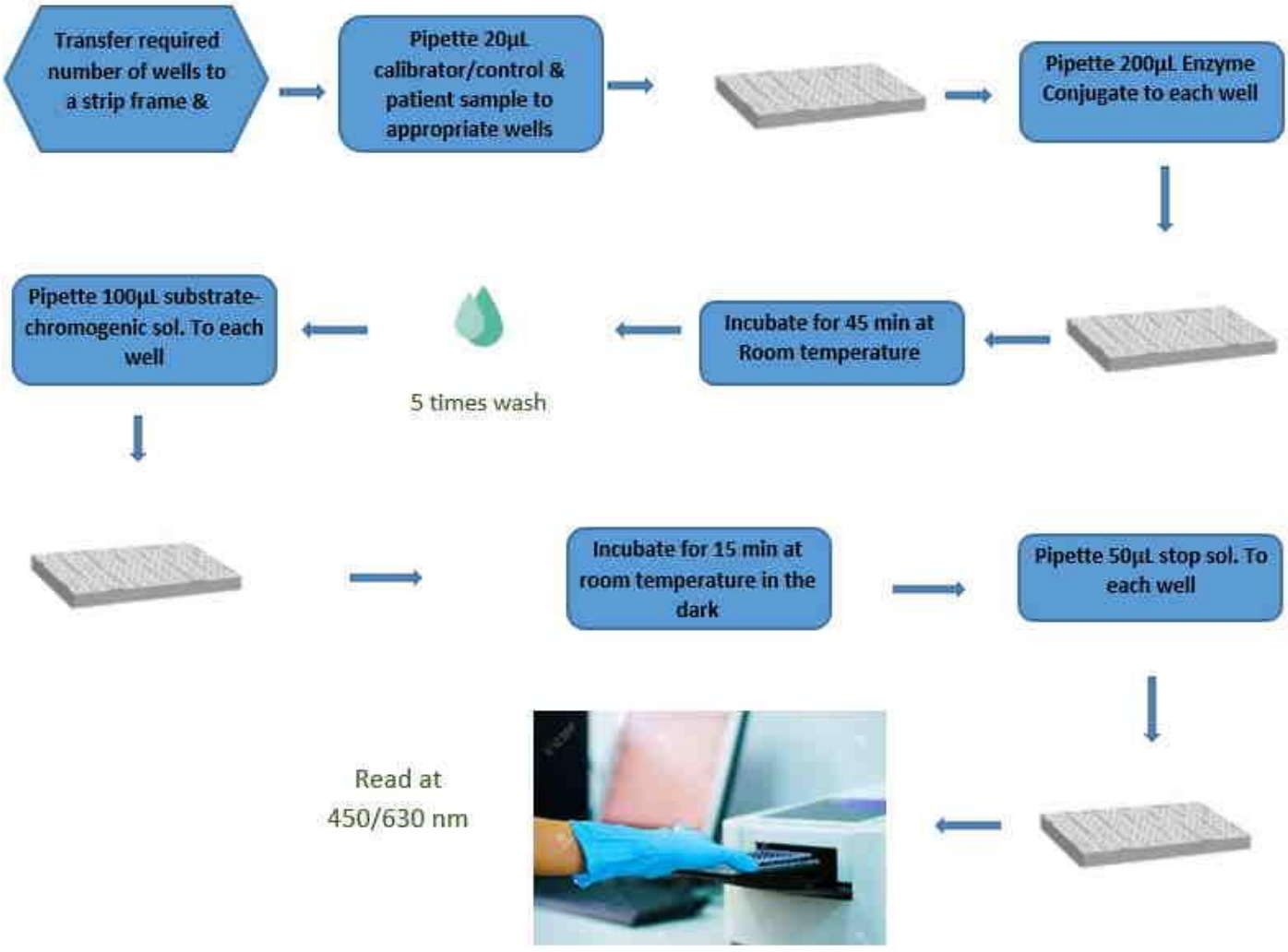
In PSI Ferritin EIA kit high dose hook effect has not been seen up to 5000 ng/mL

References:

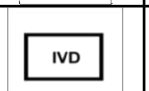
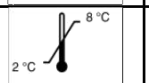
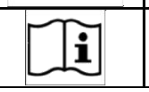
1. CLSI. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP 17-A2. Pierson-Perry J.F. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2012.
2. CLSI. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline. 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. Hoffbrand A.W. et al. (2016). Postgraduate Haematology.7th 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. 627-628) Mc Graw Hill Education
7. Pagana K.D. et al. (2018). Mosby's Manual of diagnostic and Laboratory tests.6th ed. Elsevier Inc.
8. Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics.6th ed. Elsevier Inc.

Ferritin ELISA KIT	PISHGAMAN SABJESH ISATIS	IVD-REF: PS - Ferr
		Ver. No: 02

Procedure in-brief



SYMBOLS:

	BATCH NUMBER
	USE BY
	MANUFACTURER
	CONTAINS SUFFICIENT FOR <n> TESTS
	***IN VITRO* DIAGNOSTIC MEDICAL DEVICE**
	**TEMPERATURE LIMITATION**
	CATALOGUE NUMBER
	**CONSULT INSTRUCTIONS FOR USE**