ایده آل تشخیص آتیه

کیت اندازه‌گیری Vitamin B12 در سرم انسان
Vit B12 ELISA Kit 96t
Cat. No: 6624-96 / Rev: D6 (1404/09/08)

مقدمه:

B12 یک ویتامین محلول در آب است که در طیف وسیعی از فرایندهای فیزیولوژیک نقش دارد. دخالت در تشکیل گلبول‌های قرمز خون و همچنین تشکیل غلاف میلین در اطراف بافت عصبی ازجمله مهم‌ترین نقش‌های این ویتامین هستند. ویتامین B12 معمولاً از منابع غذایی حیوانی تأمین می‌گردد. سالمندان و افرادی که گیاه‌خوار هستند در معرض خطر کمبود این ویتامین قرار دارند. نتایج حاصل از اندازه‌گیری هم‌زمان سطح متیل مالونیل CoA و هوموسیستئین نیز در تشخیص افتراقی کمبود ویتامین B12 از کمبود فولات به‌کار برده می‌شوند. کمبود ویتامین B12 و فولات هر دو دارای علائم بالینی مشابهی شامل افزایش مقدار هوموسیستئین هستند. با این وجود، تنها در کمبود ویتامین B12، افزایش سطح متیل مالونیل CoA رخ می‌دهد. حیطه کاربرد این کیت اندازه‌گیری سطح ویتامین B12 در نمونه‌های سرم به روش الایزا می‌باشد.

اصول آزمایش:

این آزمایش براساس الایزای رقابتی طراحی شده است. در این روش نمونه‌ها، کالیبراتورها و کنترل به‌همراه کونژوگه بیوتینی به چاهک‌های حاوی **استرپتاویدین** تثبیت شده اضافه می‌شوند. پس از اتصال ویتامین B12 به آنتی‌بادی بیوتینیله، کونژوگه آنزیمی (ویتامین B12 متصل به آنزیم HRP) اضافه می‌شود. رقابت بین آنتی‌ژن کونژوگه و آنتی‌ژن نمونه برای اتصال به جایگاه‌های محدود آنتی‌بادی‌ها (که در زمان انکوباسیون اول واکنش نداده‌اند) ایجاد می‌شود. پس از شستشو و حذف ترکیبات متصل نشده، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده محصول نهایی تولید می‌شود که بیشترین جذب نوری را در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر دارد. میزان رنگ ایجاد شده و در نتیجه شدت جذب نوری در هر چاهک، با غلظت ویتامین B12 موجود در سرم و کالیبراتورها ارتباط معکوس دارد. درنهایت غلظت این ویتامین در نمونه‌ها به کمک منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

۱) میکروپلیت ۹۶تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
۲) کالیبراتورها (Vit B12 Cal A-F) : شش ویال با غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ pg/mL.
۳) کونژوگه آنزیمی (Vit B12 Enzyme Conjugate): یک ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌ژن متصل به آنزیم HRP در بافر.
۴) کونژوگه بیوتینی (Vit B12 Biotin Conjugate): یک ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی متصل به بیوتین در بافر.
۵) محلول آزادکننده (Vit B12 Releasing Agent): یک ویال ۱۳ میلی‌لیتری.
۶) محلول پایدارکننده (Vit B12 Stabilizing Agent): یک ویال ۰/۷میلی‌لیتری.
۷) بافر خنثی‌کننده (Vit B12 Neutralizing Buffer): یک ویال ۶ میلی‌لیتری.
۸) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
۹) محلول رنگزا (Substrate Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۱۰) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۱۱) محلول کنترل (Vit B12 Control): ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری.
۱۲) برچسب مخصوص پلیت: یک ورق.

توجه ۱: تمام محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است. محتویات کیت پس از باز شدن به مدت ۶۰ روز در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد پایدار هستند.

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

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

۱) دستگاه خوانش‌گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
۲) سمپلر کالیبره.
۳) آب مقطر دیونیزه.

احتیاط در استفاده از کیت:

۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.
۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBsAg، HIV1/2 و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شوند.
۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری نمایید.
۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم است. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید. به‌علت ناپایداری ویتامین B12 در برابر اشعه UV، از قرار دادن نمونه‌ها در معرض نور خودداری کنید. بهتر است نمونه‌های سرم بلافاصله مورد استفاده قرار گیرند.
۲) در صورت نیاز به نگهداری نمونه‌ها، درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها در لوله در بسته و تیره رنگ در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد حداکثر به مدت ۵ روز و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد حداکثر به‌مدت ۳۰ روز قابل استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.
۳) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین (>5 mg/day) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.

آماده‌سازی معرف‌ها و نمونه‌ها:

۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.
۲) آماده‌سازی محلول استخراج: محلول‌های پایدارکننده و آزادکننده را با نسبت ۱:۳۹ مخلوط نمایید (به‌عنوان مثال ۱۰۰ میکرولیتر محلول پایدارکننده را به ۳/۹ میلی‌لیتر محلول آزادکننده اضافه کنید). توصیه می‌شود که این محلول قبل از مصرف و به مقدار نیاز تهیه شود.
۳) استخراج نمونه: به تعداد نمونه‌های بیمار لوله آزمایش شیشه‌ای تهیه نمایید. به هر لوله ۱۰۰ µl از نمونه و ۵۰ µl از محلول استخراج آماده مصرف اضافه کرده و پس از مخلوط کردن (سه بار ورتکس هر بار به‌مدت ۳ تا ۵ ثانیه) به مدت ۱۵دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید. سپس ۵۰µl از بافر خنثی‌کننده اضافه کنید. لوله‌ها را پس از مخلوط کردن (سه بار ورتکس هر بار به‌مدت ۳ تا ۵ ثانیه) به‌مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

توجه: حتی الامکان برای استخراج نمونه از لوله‌های شیشه‌ای تازه و نو استفاده کنید. دقت فرمایید که لوله‌های شیشه‌ای کاملاً تمیز و فاقد املاح باشند.

نکته: کالیبراتورها و کنترل‌ها آماده مصرف می‌باشند و احتیاج به استخراج ندارند.

روش انجام آزمایش:

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

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام تست را بردارید و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید.
۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کنترل، کالیبراتورها و نمونه‌های استخراج شده را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی در چاهک‌ها ریخته شود.
۳) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه بیوتینی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید.
۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به‌مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
۵) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید سپس به مدت۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
۶) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا آسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده مصرف، (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت[1] اقدام نمایید.
۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری نمایید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به‌مدت ۱۵ دقیقه افزایش دهید.

۸) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید تا رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.
۹) جذب نوری هر چاهک را در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش اندازه‌گیری کنید (از طول‌موج رفرانس ۶۲۰ تا۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). در این آزمایش محاسبه غلظت به روش Point to Point و 4PL (یا Logic-log) قابل اجرا است؛ در صورت استفاده از روش 4PL غلظت کالیبراتور A را عددی کوچک (به‌عنوان مثال 0.01 pg/mL) در نظر بگیرید.

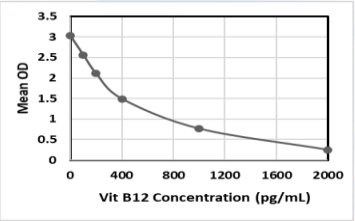
[1] http://www.idealdiag.com/Training.aspx

ISO13485 KGS

ایده آل تشخیص آتیه

میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر ارائه شده است.

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (pg/mL)
Cal. A	A1	2.958	3.031	0
	B1	3.104		
Cal. B	C1	2.537	2.564	100
	D1	2.591		
Cal. C	E1	2.106	2.109	200
	F1	2.113		
Cal. D	G1	1.433	1.494	400
	H1	1.555		
Cal. E	A2	0.791	0.765	1000
	B2	0.739		
Cal. F	C2	0.233	0.248	2000
	D2	0.263		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای ویتامین B12

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این آزمایش را به‌قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر برای آنالیت مورد نظر باید توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

Population	pg/mL	pmol/L
Newborn	160-1300	118-957
Adult	200-835	147-615
Adult>60 Years	110-800	81-589
pg/mL × 0.736 = pmol/L		

پارامترهای کنترل کیفی

۱) بررسی دقت- آزمون دقت درون‌دور (Within Run)

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت و سه سطح کنترل در یک نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV<13.2% است.

Sample/ Control	1	2	3	Ctrl. 1	Ctrl. 2	Ctrl. 3
No. of Repeats	20	20	20	20	20	20
Mean (pg/mL)	251	782	1877	453	742	1304
SD (pg/mL)	13.6	38.3	64.2	25.8	43.7	75.3
CV (%)	5.4	4.9	3.4	5.7	5.9	5.8

۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین‌دور (Between Run)

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت و سه سطح کنترل در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV<13.2% است.

Sample/ Control	1	2	3	Ctrl. 1	Ctrl. 2	Ctrl. 3
No. of Repeats	20	20	20	20	20	20
Mean (pg/mL)	356	793	1379	451	743	1298
SD (pg/mL)	21.6	44.6	71.8	29.1	44.6	72.3
CV (%)	6.1	5.6	5.2	6.4	6.0	5.6

۳) بررسی درستی - آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به‌عنوان یک نمونه، غلظت ویتامین B12 در آن سنجش گردید. معیار پذیرش در این آزمایش، Bias<10% نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (pg/mL)	Added (pg/mL)	Exp. (pg/mL)	Obs. (pg/mL)	% Rec.
1	95	457	276	284	102.9
2	718	94	406	421	103.7
3	456	718	587	573	97.6

۴) بررسی درستی- آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست غلظت ویتامین B12 در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش Bias<10% است.

No.	Sample (pg/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	1286	-2.8	1.5	-1.5	-1.3
2	1540	-1.4	1.2	2	-2.3
3	1800	3.6	-3.3	-3	-0.3

۵) بررسی درستی- مقایسه روش‌ها (Comparison of Methods)

جهت بررسی درستی نتایج این کیت، میزان ویتامین B12 در ۱۰۰ نمونه سرم با مقادیر پایین، نرمال و بالا اندازه‌گیری شد و نتایج آن با کیت مرجع مقایسه و ضریب همبستگی بین نتایج به‌دست‌آمده از دو کیت، بر اساس روش پیرسون، ۰/۹۹۳ محاسبه گردید. معیار پذیرش برای این آزمایش به صورت زیر تعریف شده است:

$$0.9 \le \text{Pearson Correlation Coefficient} \le 1.0$$

۶) بررسی ویژگی- آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)

ویژگی این آزمایش به کمک اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مندرج در جدول زیر به نمونه‌های سرم، ارزیابی شده است. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین مقدار ماده اضافه شده به مقدار ویتامین B12 مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، بررسی شده است. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده ۱۰±۱۰۰ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Substances	Cross Reactivity
Rheumatoid Factor	0.0008
Cobinamide	< 0.0001

۷) بررسی تداخلات (Interference)

بر اساس فرمول زیر، درصد تداخلات رایج در سنجش ویتامین B12 مورد ارزیابی قرار گرفت:

$$\text{درصد تداخل} = \frac{\text{میانگین غلظت قبل از افزودن آنالیت مداخله گر} - \text{میانگین غلظت بعد از افزودن آنالیت مداخله گر}}{\text{غلظت آنالیت مداخله‌گر}} \times ۱۰۰$$

براساس نتایج بدست آمده، هموگلوبین تا ۵۰۰، بیلی‌روبین تا ۳۰ و تری‌گلیسرید تا ۲۵۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر تأثیری بر نتیجه سنجش ندارد.

۸) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of (LOB) Blank با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با ۷۰/۱۵ pg/mL تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645\ SD_s$$
$$LOB = Mean_b + 1.645\ SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

۹) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی نتایج به‌صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص‌شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

علائم استفاده شده در برچسب کالاها

EC REP	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
LOT	Batch code
IVD	In vitro diagnostic medical device
CE	European conformity
REF	Catalogue number
Σ	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

1. McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
2. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
3. Tietz. Reference information for the clinical laboratory. Hn Textbook of clinical chemistry. Burtis, CA, Ashwood, RA, WB, Saunders. Philadelphia; 1999.

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

توجه: چنانچه از دستگاه‌های الایزا پروسسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.

دفتر مرکزی: تهران - بزرگراه آبشناسان - سردارجنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۸
کارخانه: کرج - کمالشهر، شهرک صنعتی بهارستان، انتهای گلستان دوم غربی، پلاک ۱۱ تلفن: ۲۳-۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹.