کیت اندازه‌گیری Vitamin B12 در سرم انسان
Vit B12 ELISA Kit 96t / Cat. No: 6624-96
Brochure Rev: 06 (1400/04/21)

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.

اصول آزمایش:

این آزمایش بر پایه سنجش ایمنی رقابتی تأخیری انجام می‌شود. در این روش نمونه‌ها، کالیبراتورها و کنترل به‌همراه کونژوگه بیوتینی (آنتی‌بادی مونوکلونال بیوتینیله شده ضد ویتامین B12) به چاهک‌های حاوی استرپتاویدین تثبیت شده[1] اضافه می‌شوند. پس از اتصال ویتامین B12 به آنتی‌بادی بیوتینیله، کونژوگه آنزیمی (ویتامین B12 کونژوگه با آنزیم HRP) اضافه می‌شود. افزودن با تأخیر کونژوگه آنزیمی سبب افزایش حساسیت تست به‌ویژه برای نمونه‌های با غلظت کم ویتامین B12 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، سوبسترای آنزیم HRP و سپس محلول متوقف‌کننده اضافه می‌شود. 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 (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

۱) میکروپلیت ۹۶تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
۲) کالیبراتورهای Vit B12 : ۶ ویال با غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ pg/ml. کالیبراتورهای موجود در این کیت مطابق با استاندارد بین‌المللی WHO کد 03/178 کالیبره شده‌اند.
۳) کونژوگه آنزیمی Vit B12: ۱ ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌ژن متصل به آنزیم HRP در بافر.
۴) کونژوگه بیوتینی Vit B12: ۱ ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی متصل به بیوتین در بافر.
۵) محلول آزادکننده Vit B12: ۱ ویال ۱۳ میلی‌لیتری.
۶) محلول پایدارکننده Vit B12: ۱ ویال ۰/۷میلی‌لیتری.
۷) بافر خنثی‌کننده Vit B12: ۱ ویال ۶ میلی‌لیتری.
۸) محلول شستشو (50X): ۱ ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
۹) محلول رنگ‌زا A: ۱ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۱۰) محلول رنگ‌زا B: ۱ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۱۱) محلول متوقف‌کننده واکنش: ۱ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۱۲) محلول کنترل: ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری.
۱۳) برچسب مخصوص پلیت.

توجه: 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.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند:

۱) دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر و ۶۳۰ نانومتر به‌عنوان فیلتر رفرانس.
۲) آب مقطر.

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، HIV و HCV 1/2 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 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.

جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم است. گرفتن خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی انجام شود و سرم به‌سرعت از سلول‌های خونی جدا گردد. از انجام تست بر روی نمونه‌های لیپمیک همراه با کدورت و همولیز خودداری نمایید. 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. نمونه‌ها در لوله در بسته و تیره رنگ در دمای بین ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد حداکثر به مدت ۵ روز و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد حداکثر به مدت ۳۰ روز قابل استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.
۲) 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) تهیه محلول شستشو (آماده مصرف): کل محتویات محلول شستشو (50X) را با۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کنید و پس از آماده‌سازی در یخچال نگهداری نمایید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو آن‌را در بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو از مصرف آن خودداری نمایید.
۲) تهیه محلول رنگ‌زا (آماده مصرف): محلول‌های رنگ‌زا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگ‌زا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگ‌زا B اضافه نمایید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگ‌زا، از مصرف آن خودداری فرمایید.
۳) تهیه 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.
۴) استخراج نمونه، کالیبراتور و کنترل: به تعداد نمونه‌های بیمار، کالیبراتورها و کنترل لوله آزمایش شیشه‌ای تهیه نمایید. به هر لوله آزمایش ۱۰۰ µl از نمونه و ۵۰ µl از محلول استخراج اضافه کرده و پس از مخلوط کردن (سه بار ورتکس هر بار به مدت ۱ تا ۲ ثانیه) به مدت ۱۵دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید. سپس ۵۰µl از بافر خنثی‌کننده اضافه و سپس ورتکس کنید (سه بار ورتکس هر بار به مدت ۱ تا ۲ ثانیه).

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.

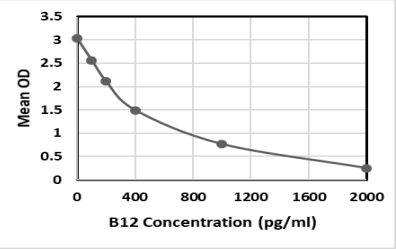
روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش اطمینان حاصل کنید که کالیبراتورها، معرف‌ها (با حجم‌های متفاوت)، پلیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۴ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها را با سر و ته کردن به آرامی یکنواخت نمایید.

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 نگه داری نمایید.
۲) ۵۰ میکرولیتر از کنترل استخراج شده، کالیبراتورهای استخراج شده یا نمونه‌های استخراج شده را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (Duplicate) در چاهک‌ها ریخته شود.
۳) ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه بیوتینی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
۵) ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید سپس به مدت۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
۶) محتویات چاهک‌ها را تخلیه کرده و آن‌ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو (آماده مصرف) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.
۷) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگ‌زا (آماده مصرف) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید.
۸) ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام 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 تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). در این آزمایش محاسبه غلظت به روش Point to Point قابل اجرا است؛ اما روش 4PL (یا Logic-log) ارجحیت دارد. 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		

[1] Immobilized



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای ویتامین B12

در این تست، میزان ویتامین B12 در ۴۰ نمونه سرم از افراد سالم در گروه‌های سنی متفاوت اندازه‌گیری شد و دامنه نرمال ویتامین B12 با پراکندگی در ۹۵٪ افراد جامعه محاسبه گردید.

جمعیت	pg/ml	pmol/L
نوزاد	160-1300	118-959
بزرگسال	200-835	148-616
بزرگسال ۶۰ <	110-800	81-590
pg/ml × 0.736 = pmol/L		

پارامترهای کنترل کیفی:

بر اساس راهنمایی‌های موجود در استانداردهای EN 13641 و CLSI، نتایج حاصل از تست‌های کیت ویتامین B12 در محدوده قابل قبول می‌باشد.

Intra – Assay (بررسی دقت)

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه متفاوت سرم و سه سطح کنترل در یک نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

Sample/ Control	1	2	3	Cont. 1	Cont. 2	Cont. 3
No. of Repeats	20	20	20	20	20	20
Mean (pg/ml)	251	782	877	453	742	1304
SD (pg/ml)	13.6	40.2	48.3	25.8	43.7	75.3
CV (%)	5.4	5.1	5.5	5.7	5.9	5.8

Inter - Assay (بررسی دقت)

دقت بین‌تستی با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه متفاوت سرم و سه سطح کنترل در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

Sample/ Control	1	2	3	Cont. 1	Cont. 2	Cont. 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. 1	5.6

Recovery (بررسی درستی [1])

در این تست دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به‌عنوان یک نمونه، غلظت Vit B12 در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این تست انحراف کمتر از ۱۰ درصد 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

Linearity (بررسی درستی)

در این تست، 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	286	-2.8	1.5	-1.5	-1.3
2	840	-1.4	1.2	2	-2.3
3	1500	3.6	-3.3	-3	-0.3

Comparison of Methods (بررسی درستی)

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

0.9≤Pearson Correlation Coefficient≤1.0

Interferences (بررسی اختصاصیت)

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

$$\text{درصد تداخل} = \frac{\text{میانگین غلظت قبل از افزودن آنالیت مداخله گر} - \text{میانگین غلظت بعد از افزودن آنالیت مداخله گر}}{\text{غلظت آنالیت مداخله‌گر}} \times 100$$

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

[1] Trueness

Cross Reactivity (واکنش متقاطع)

ویژگی کیت اندازه‌گیری B12 توسط اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از RF و Cobinamide به سرم و اندازه‌گیری نسبت بین مقدار ماده اضافه شده به مقدار B12 مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، بررسی شد. نتایج نشان داد که این ترکیبات با آنتی‌بادی ویتامین B12 واکنش متقاطع ندارند. 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

Sensitivity (بررسی حساسیت)

حداقل غلظت قابل‌تشخیص (LOD) در این کیت بر اساس جمع میانگین جذب نوری کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف معیار حاصل از ۲۰ بار تکرار یک نمونه با غلظت کم ۷۰/۱۵ pg/ml می‌باشد.

Stability (بررسی پایداری)

Accelerated Stability Test: کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس نتایج آن بررسی و با نتایج روز صفر مقایسه گردید.

In Use Stability Test: پس از باز کردن درب محلول‌ها، کیت به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس نتایج حاصل از آن با نتایج روز صفر مقایسه گردید.

Shelf Stability Test: ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و هر سه ماه یک بار بررسی گردید. نتایج هر بررسی با نتایج روز صفر مقایسه شد.

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص‌شده پایدار است. معیار پذیرش در این آزمایش‌ها تغییر OD نمونه‌ها کمتر از ۲۰ درصد است.

علائم استفاده شده در برچسب کالاها

EC REP	Authorized representative in the European Community
	Date of manufacture
	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

References:

1. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; Nov 8 (2013).
2. Alataş F, Alataş Ö, Metintaş M, Çolak Ö, Harmanci E, Demir S. Diagnostic value of CEA, CA 15-3, CA 19-9, CYFRA 21-1, NSE and TSA assay in pleural effusions. Lung cancer. 31(1): 9-16. Jan 1 (2001).
3. Tietz. Reference information for the clinical laboratory. Hn Textbook of clinical chemistry. 3rd ED. 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.

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 ۱۳ تلفن: ۲۳-۰۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹