دیاپلاس

DIAPLUS

DiaPlus

کیت ۹۶ تستی اندازه‌گیری Folate به روش الایزا

Brochure Rev: B0 (1402/12/05)

REF 6544-96

اهمیت بالینی

فولات (Folate) که به‌عنوان ویتامین B9 نیز شناخته می‌شود در فرایندهای زیستی متعدد و مهمی مانند سنتز اسیدهای نوکلئیک، رشد لوله عصبی جنین و عملکرد طبیعی سلول‌های خونی مؤثر است. سطح نرمال فولات خون نیازمند جذب طبیعی آن در روده و رژیم غذایی مناسب است. در شرایط کمبود اولیه ویتامین B12، توانایی سلول‌ها در دریافت فولات مختل می‌شود و در چنین شرایطی درمان با ویتامین B12 ضروری است. بررسی میزان فولات در حاملگی، ارزیابی اختلالات همولیتیک و آنمی مگالوبلاستیک اهمیت دارد. کمبود فولات در ۳۳ درصد از زنان حامله، بسیاری از الکلی‌ها و بیماری‌های سلیاک و کرون مشاهده می‌شود. سطوح افزایش یافته سرمی فولیک اسید ممکن است در بیماران با آنمی وخیم دیده شود. حیطه کاربرد این کیت اندازه‌گیری غلظت فولات در سرم انسان می باشد.

اصول آزمایش

این تست بر پایه الایزای رقابتی طراحی شده است. بی‌حرکت‌سازی کمپلکس‌های ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهک و آنتی‌بادی بیوتینیله صورت می‌پذیرد. نمونه‌های سرم و کالیبراتور (حاوی آنتی‌ژن آزاد و غیرکونژوگه)، فولات کونژوگه با آنزیم HRP و آنتی‌بادی بیوتینیله شده ضد فولات به چاهک‌ها اضافه می‌شوند. آنتی‌ژن‌ها برای اتصال به آنتی‌بادی ضد فولات بیوتینیله که به استرپتاویدین کف چاهک متصل شده است با یکدیگر رقابت می‌کنند. پس از تخلیه و شستشوی چاهک، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که بیشترین میزان جذب نوری را در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر دارد. میزان رنگ و در نتیجه شدت جذب نوری با غلظت فولات در نمونه و یا کالیبراتورها ارتباط معکوس دارد. در نهایت غلظت فولات در هر نمونه به کمک منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت

۱) **کالیبراتورها (Calibrators) ۰/۷۵ میلی‌لیتر:**
شامل شش ویال با غلظت‌های ۰، ۱، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۵ ng/mL، تهیه شده از سرم انسان.

۲) **محلول کونژوگه آنزیمی (Folate Enzyme Conjugate) ۶ میلی‌لیتر:**
یک ویال حاوی آنتی‌ژن متصل به آنزیم HRP در بافر.

۳) **محلول کونژوگه بیوتینی (Folate Biotin Conjugate) ۶ میلی لیتر:**
یک ویال شامل محلول آنتی‌بادی متصل به بیوتین در بافر.

۴) **پلیت ۹۶ تستی:**
یک پلیت حاوی استرپتاویدین تثبیت‌شده که به همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی بسته‌بندی شده است.

۵) **معرف آزادکننده (Folate Releasing Agent) ۱۳ میلی‌لیتر:**
یک ویال حاوی معرف آزادکننده که فولات را از پروتئین‌های اتصالی آزاد می‌کند.

۶) **محلول پایدارکننده (Folate Stabilizing Agent):**
یک ویال ۰/۷ میلی‌لیتری.

۷) **بافر خنثی‌کننده (Folate Neutralizing Buffer):**
یک ویال ۶ میلی‌لیتری.

۸) **محلول شستشو غلیظ (Wash Buffer-50X) ۲۰ میلی‌لیتر:**
یک ویال شامل سورفاکتانت محلول شده در بافر فسفات.

۹) **محلول سوبسترا (Substrate Solution) ۱۲ میلی‌لیتر:**
یک ویال حاوی محلول ترا متیل بنزیدین (TMB) و محلول هیدروژن پراکساید (H_2O_2) در بافر.

۱۰) **محلول متوقف‌کننده (Stop Solution) ۱۲ میلی‌لیتر:**
یک ویال حاوی محلول متوقف‌کننده واکنش.

۱۱) **سرم کنترل سطح یک (Control Level 1):**
یک ویال حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر سرم کنترل سطح یک.

۱۲) **سرم کنترل سطح دو (Control Level 2):**
یک ویال حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر سرم کنترل سطح دو.

ISO13485:2016 KGS

۱۳) **برچسب مخصوص پلیت:**
یک ورق.

توجه ۱: کلیه اجزای کیت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود. محلول متوقف‌کننده را می‌توان در دمای اتاق نگهداری کرد.

توجه ۲: مقادیر کنترل‌ها در برگه 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.

موارد احتیاط در استفاده از کیت

- این کیت برای انجام تست‌های تشخیصی در محیط‌های آزمایشگاهی کاربرد دارد. محتویات کیت منشاء سرم انسانی داشته و از نظر عدم وجود HBsAg و آنتی‌بادی‌های ضد HIV1/2 و HCV کنترل شده‌اند، اما از آنجا که هیچ روشی به‌طور صددرصد نمی‌تواند منفی بودن این موارد را تأیید نماید، بنابراین لازم است هنگام استفاده از کیت، مراقبت‌های لازم به عمل آورده شود.
- محتویات تعبیه شده در این کیت برای استفاده در همین سری ساخت بوده و از استفاده مشترک با سایر سری ساخت‌ها خودداری فرمایید.
- برای دریافت نتایج بهتر و دقیق‌تر فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ چاهک‌ها رعایت شود. این فاصله زمانی نباید به گونه‌ای باشد که منجر به اثر دریفت (drift) گردد. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل این نکته حائز اهمیت است. دقت نمایید محلول‌ها نزدیک به ته چاهک ریخته شوند.
- شستشوی نامناسب می‌تواند باعث بوجود آمدن نتایج اشتباه در آزمایش شود.
- کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از استفاده از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است خودداری نمایید.

جمع آوری و تهیه نمونه ها

- نمونه مورد استفاده در این آزمایش سرم انسانی می‌باشد که از خون سیاهرگی تهیه شده و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا می‌گردد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
- نگهداری سرم باید در لوله‌های در بسته انجام شود. نمونه‌ها تا ۱ ساعت دز دمای اتاق و تا ۲ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا ۷ روز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری می‌باشند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.
- 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.

آماده سازی محلول‌ها

محلول شستشو: کل حجم ویال محلول شستشو (50X) را با ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید. محلول آماده شده 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.

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.

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 ۵۰ µl 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.

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

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.

مراحل انجام تست

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند.

WWW.TINAPAJOOHAN.COM

Tel: 021-41796000

کلیه ویال‌های کالیبراتور، نمونه‌ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت نمایید.

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را جدا نموده و چاهک‌های باقی‌مانده به همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده، درب آن را ببندید و در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، کنترل‌ها و نمونه‌های استخراج شده را در داخل چاهک‌های مورد نظر بریزید. پیشنهاد می‌شود از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود و از میانگین جذب نوری آن‌ها استفاده شود.

۳) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به تمامی چاهک‌ها اضافه کنید. پلیت را ۳۰ ثانیه به آرامی روی سطح میز تکان دهید.

۴) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول کونژوگه بیوتینی به تمامی چاهک‌ها اضافه کنید. پلیت را ۳۰ ثانیه به آرامی روی سطح میز تکان دهید.

۵) پلیت را با برچسب بپوشانید و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۶) محتویات چاهک‌ها را در روش دستی با وارونه کردن پلیت و در روش دستگاهی با آسپیره کردن کاملاً تخلیه نمایید.

۷) چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده‌سازی محلول‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به منظور تخلیه کامل مایعات، پلیت را به آرامی بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

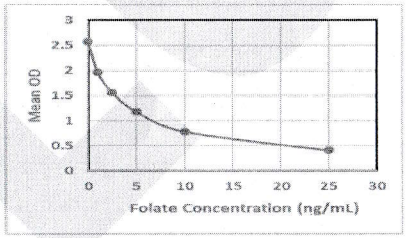
۸) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا را به چاهک‌ها اضافه نمایید و با برچسب پلیت بپوشانید. سپس پلیت را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری فرمایید.

توجه: اگر بیشترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول سوبسترا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۹) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به چاهک‌ها اضافه نموده و به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید.

۱۰) جذب نوری چاهک‌ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر در زمان کمتر از ۱۵ دقیقه بخوانید (از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ استفاده نمایید). محاسبه غلظت به روش Point to Point و 4PL قابل اجرا است. در صورت استفاده از روش 4PL غلظت کالیبراتور A را عددی کوچک (به عنوان مثال 0.01 ng/mL) در نظر بگیرید. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (ng/mL)
Cal. A	A1	2.500	2.573	0
	B1	2.646		
Cal. B	C1	1.941	1.968	1
	D1	1.995		
Cal. C	E1	1.559	1.563	2.5
	F1	1.567		
Cal. D	G1	1.118	1.179	5
	H1	1.240		
Cal. E	A2	0.750	0.776	10
	B2	0.802		
Cal. F	C2	0.388	0.403	25
	D2	0.418		



نکته: جذب نوری به دست آمده از کالیبراتورها و همچنین منحنی فوق فقط به عنوان مثال ذکر شده و در هر آزمایشگاهی در هر مرتبه آزمایش باید منحنی جدیدی ترسیم گردد.

مقادیر مورد انتظار

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

جمعیت بالغین نرمال	>3.0 (ng/mL)
1 ng/mL = 2.266 nmol/L	

پارامترهای کنترل کیفی

Intra – Assay

دقت درون‌تستی با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار) بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش CV<12% است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean (ng/mL)	245	742	1524
SD (ng/mL)	12.5	35.7	77.1
CV (%)	5.1	4.8	5.0

Inter – Assay

دقت بین‌تستی با ارزیابی نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با غلظت‌های متفاوت در چهار نوبت کاری (هر نوبت پنج بار تکرار) بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش CV<12% است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean (ng/mL)	342	721	1012
SD (ng/mL)	19.1	43.4	64.4
CV (%)	5.6	6.0	6.3

Recovery

در این تست به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به‌عنوان یک نمونه، مقدار Folate در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش Bias<19.20% است.

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	% Rec
1	91	648	369.5	370	100.1
2	356	82	219	225	102.7
3	618	458	538	540	100.3

Linearity

در این تست، غلظت Folate در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش Bias<19.20% است.

No.	Sample (ng/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	1011	4.1	2.1	4.8	-3.1
2	1452	3.9	-3.3	2.1	-2.5
3	1657	-4.8	3.1	4.1	3.7

Comparison of Methods

جهت بررسی درستی نتایج این کیت، میزان Folate 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 ۰/۹۹۵ محاسبه گردید. معیار پذیرش برای این آزمایش به صورت زیر تعریف شده است:

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

Interference

براساس فرمول زیر، درصد تداخلات رایج در سنجش Folate مورد ارزیابی قرار گرفت:

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

براساس نتایج بدست آمده هموگلوبین تا ۲۵۰، بیلی‌روبین تا ۱۵ و تری‌گلیسرید تا ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر تأثیری بر نتیجه سنجش ندارند؛ هر چند به طور عمومی توصیه بر این است که از نمونه‌های لیپمیک استفاده نشود.

Sensitivity

بر اساس جمع میانگین جذب کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف معیار، حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت ۰/۵۲ ng/mL می‌باشد.

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.

منابع

1. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; Nov 8, (2013).
2. Shane B, Tamura T, Stokstad ER. Folate assay: a comparison of radioassay and microbiological methods. Clinica Chimica Acta. 100 (1): 9-13. Jan 1, (1980).
3. Millbank L, Davis RE, Rawlins M, Waters AH. Automation of the assay of folate in serum and whole blood. Journal of clinical pathology. 23 (1):54-9. Feb 1, (1970).

در صورت بروز هرگونه مشکل با بخش پشتیبانی شرکت تینا پژوهان آروین تماس حاصل فرمایید.

DIAPLUS
شرکت تینا پژوهان اروین
سهروردی شمالی ، پایین تر از آپادانا،
کوچه فیروزه، پلاک ۳ واحد ۱ و ۲
تلفن: ۰۲۱-۴۱۷۹۶۰۰۰