

اهمیت بالینی

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 از جمله 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 هموسیستئین 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 هموسیستئین 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 کنترل‌ها 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 آنکوباسیون اول واکنش ندادند) 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 طول موج 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. در نهایت غلظت این ویتامین در نمونه‌ها به کمک منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت

- ۱) کالیبراتورها (Calibrators) ۰/۷۵ میلی‌لیتر:
شامل شش ویال با غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ pg/mL تهیه شده از سرم انسان.
- ۲) محلول کونژوگه آنزیمی (Vitamin B12 Enzyme Conjugate) ۶ میلی‌لیتر:
یک ویال حاوی آنتی‌ژن متصل به آنزیم HRP در بافر.
- ۳) محلول کونژوگه بیوتینی (Vitamin B12 Biotin Conjugate) ۶ میلی‌لیتر:
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 (Vitamin B12 Releasing Agent) ۱۲ میلی‌لیتر:
یک ویال حاوی معرف آزادکننده که ویتامین **B12** را از پروتئین‌های اتصال‌ی آزاد می‌کند.
- ۶) محلول پایدارکننده (Vitamin B12 Stabilizing Agent) یک ویال ۰/۷۵ میلی‌لیتر.
- ۷) بافر خنثی‌کننده (Vitamin B12 Neutralizing Buffer) یک ویال ۶ میلی‌لیتر.
- 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 تترا متیل بنزیدین (TMB) و محلول هیدروژن پراکسید (H2O2) 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.
- 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 خوانش گر 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 منشأ 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 انقضای کیت پایدار هستند. از استفاده از محلول‌هایی که تاریخ انقضای آن‌ها گذشته است خودداری نمایید.

جمع‌آوری و تهیه نمونه‌ها

- 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 در دمای اتاق و تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری می‌باشند و در صورت استفاده برای مدت زمان طولانی‌تر (حداکثر تا ۳۰ روز) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. از متجمد 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، کالیبراتور و کنترل: به تعداد نمونه‌های بیمار، کالیبراتورها و کنترل لوله آزمایش شیشه‌ای تهیه نمایید. به هر لوله ۱۰۰ الی ۵۰ از نمونه، کنترل و یا کالیبراتور و ۱۰۰ الی ۵۰ از محلول استخراج آماده مصرف اضافه کرده و پس از مخلوط کردن (سه بار ورتکس هر بار به‌مدت ۳ تا ۵ ثانیه) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق آنکوبه نمایید. سپس ۵۰ الی ۵۰ 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 آنکوبه نمایید.

Cross Reactivity

اختصاصیت این آزمایش با اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مداخله‌گر به سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین دوز ماده مداخله‌گر به دوز Vit B12 مورد نیاز برای همان مقدار جذب ارزیابی شد.

Substances	Cross Reactivity
Rheumatoid Factor	0.0008
Cobinamide	< 0.0001

Interference

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

$$\% \text{ تداخل} = \frac{\text{میانگین غلظت قبل از افزودن آنتی تداخل گر - میانگین غلظت بعد از افزودن آنتی تداخل}}{\text{میانگین غلظت قبل از افزودن آنتی تداخل}} \times 100$$

بر اساس نتایج بدست آمده هموگلوبین تا ۵۰۰، بیلی‌روبین تا ۳۰ و تری‌گلیسرید تا ۲۵۰۰ 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 ۷۰/۱۵ pg/mL می‌باشد.

Stability

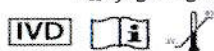
مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر تا زمان انقضای درج شده بر روی پرچسب آن پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

منابع

References:

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 آروین
سهروردی شمالی، پایین تر از آپادانا،
کوچه فیروزه، پلاک ۳ واحد ۲ و ۱
تلفن: ۰۲۱-۴۱۷۹۶۰۰۰

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 $CV < 13.2\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean (pg/mL)	273	779	1711
SD (pg/mL)	15.0	39.1	80.4
CV (%)	5.5	5.0	4.7

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 $CV < 13.2\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean (pg/mL)	353	744	1247
SD (pg/mL)	20.3	40.1	63.2
CV (%)	5.7	5.4	5.0

Recovery

در این تست به ازاء هر آزمون دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به‌عنوان یک نمونه، مقدار Vit B12 در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 10\%$ است.

No.	Sample (pg/mL)	Added (pg/mL)	Exp. (pg/mL)	Obs. (pg/mL)	% Rec
1	102	652	377	373	99
2	423	91	257	285	103.1
3	641	425	533	540	101.3

Linearity

در این تست، غلظت Vit 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	1210	4.1	2.1	4.8	-3.1
2	1642	3.9	-3.3	2.1	-2.5
3	1784	-4.8	3.1	4.1	3.7

Comparison of Methods

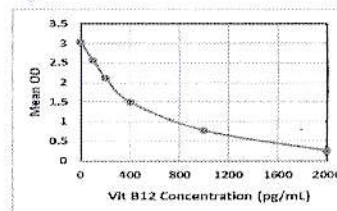
جهت بررسی درستی نتایج این کیت، میزان Vit B12 در ۱۰۰ نمونه سرم با مقادیر پایین، نرمال و بالا توسط این کیت اندازه‌گیری شد و نتایج آن با کیت مرجع مقایسه و ضریب همبستگی بین نتایج به دست آمده از دو کیت، بر اساس روش پیرسون ۰/۹۹۳ محاسبه گردید. معیار پذیرش برای این آزمایش به صورت زیر تعریف شده است:

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

(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 pg/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. (pg/mL)
			OD	
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	2.105	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		



تکنه: 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.

Population	pg/mL	pmol/L
Newborn	160-1300	118-957
Adult	200-835	147-615
Adult > 60 Years	110-800	81-589
$\text{pg/mL} \times 0.736 = \text{pmol/L}$		

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. کلیه ویال‌های کالیبراتورها، 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 الومینیومی قرار داده، درب آن را ببندید و در دمای ۲-۸ 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 بیوتینی به تمامی چاهک‌ها اضافه کنید. پلیت را ۳۰ ثانیه به آرامی روی سطح میز تکان دهید.

(۴) پلیت را با پرچسب بپوشانید و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

(۵) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به تمامی چاهک‌ها اضافه کنید. پلیت را ۳۰ ثانیه به آرامی روی سطح میز تکان دهید. و سپس به مدت ۳۰ 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 پرچسب 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.