کیت الایزا Vitamin B12 نام سرم	PISHGAMAN	Vitamin B12 ELISA KIT

کاربرد:

کیت Vitamin B12 ELISA شرکت پیشگامان سنجش برای اندازه گیری کمی ، ویتامین B12 در سرم یا پلاسما طراحی گردیده است.

مقدمه :

ویتامین B12 که به نام کوبالامین نیز خوانده می شود مجموعه ای فلزی-آلی است که در آن یک اتم کبالت درون حلقه تتراپیرولی کورین قرار گرفته است. ویتامین B12 ویتامینی محلول در آب است، که به وسیله میکروارگانیسم ها ساخته می شود. بدن انسان قادر به تولید این ویتامین نیست و کمتر در غذاهای گیاهی یافت می شود. مهمترین منبع ویتامین B12 گوشت، ماهی ، تخم مرغ و فرآورده های لبنی است. میزان برداشت ویتامین B12 از طریق مجرای گوارش بستگی به عامل داخلی(Intrinsic Factor) که توسط سلول های جداری(Parietal) معده ساخته شده و پذیرنده کوبام(Cobam receptor)در ایلئوم انتهایی دارد. مهمترین علت کمبود شدید ویتامین B12 فقدان عامل داخلی ناشی از التهاب آتروفیک اتوایمیون معده می باشد. بنا به دلایل تاریخی بیماری، آنمی کشنده(Pernicious Anemia) نامیده می شود، هرچند تظاهرات عصبی کمبود ویتامین B12. بارزتر از سایر یافته های کمبود ویتامین B12 می باشد. سایر علل کمبود ویتامین B12 شامل سوء جذب ناشی از برداشتن معده، بیماری التهابی روده(IBD) یا کمبود آن در مواد غذایی، نظیر آنچه که در گیاهخواران دیده می شود، می باشد.

ویتامین B12 به عنوان عامل کمکی(Cofactor) دو آنزیم متیونین سنتاز و متیل مالونیل کوآ- موتاز می باشد. جایگاه متیونین سنتاز در سیتوپلاسم است و به ویتامین B12 به فرم متیل کوبالامین نیاز دارد و تبدیل هموسیستئین به متیونین را به عنوان اسیدآمینه ای ضروری کاتالیز می کند. طی این مرحله گروه متیل از متیل تتراهیدروفولات به اسیدآمینه انتقال می یابد. این آنزیم بین دو مسیر متیلاسیون، یکی از طریق ساختن دهنده متیل یعنی S-آدنوزیل متیونین و دیگری مسیری که در آن پورین ها و پیریمیدین ها از طریق تولید تتراهیدروفولات ساخته می شوند، ارتباط برقرار می کند. ویتامین B12 در فرم $5'$-داکسی آدنوزیل کوبالامین برای آنزیم میتوکندریایی متیل مالونیل کوآ موتاز که متیل مالونیل کوآ را به سوکسینیل کوآ تبدیل می کند نیز ضروری است. این واکنش مرحله ای در اکسیداسیون اسیدهای چرب فردزنجیره و سوخت و ساز اسیدهای آمینه مولد اجسام کتونه را شامل می شود. لذا ویتامین B12 برای ساخت DNA، بازتولید متیونین برای ساخت پروتئین و متیلاسیون و نیز بسط و شروع میلین سازی در سیستم عصبی مرکزی که لازمه عملکرد طبیعی آن است ضروری است.

کمبود ویتامین B12 نزد افراد مسن و جمعیت های فقیر بسیار شایع است و شیوع آن با افزایش سن، بیشتر می شود.

کمبود ویتامین B12 برساخت گویچه های قرمز خون اثر گذاشته و منجر به آنمی مگالوبلاستیک ناشی از ناهنجاری در ساخت DNA می گردد. علاوه برآن عملکرد عصبی را به دلیل میلین زدایی ناشی از ناهنجاری متیلاسیون در رشته های عصبی دچار اشکال کرده و باعث آسیب اعصاب محیطی، زوال عقل، نقصان اعمال شناختی و افسردگی می گردد. سایر آثار کمبود ویتامین B12 شامل افزایش خطر نقایص طناب عصبی، پوکی استخوان، بیماری های قلبی- عروقی و مغزی- عروقی می باشد. تشخیص سریع کمبود ویتامین B12 به دلیل ماهیت نهفته اختلال و خطر آسیب های پایدار مغزی بسیار حیاتی است.

معمولاً نخستین آزمایشی که تشخیص کمبود ویتامین B12 را مطرح می سازد، اندازه گیری سطح ویتامین B12 سرم است. درصورتی که کمبود ویتامین B12 مطرح شده باشد اندازه گیری سایر شاخص های بیولوژیک به ویژه اسید متیل مالونیک(MMA)و سایر آنالیت ها نظیر فولات، و هموسیستئین، و هولوترانس کوبالامین(ویتامین B12 فعال) به تشخیص بهتر کمک می کند.

اصول آزمایش :

کیت سنجش ویتامین B12 شرکت پیشگامان سنجش براساس اصول رقابتی بنا نهاده شده است. در این آزمایش ویتامین B12 موجود در سرم یا کالیبراتور/ کنترل پس از استخراج و جداسازی از پروتئین های سرم با ویتامین B12 کونژوگه با آنزیم HRP برای اتصال به آنتی بادی مونوکلونال علیه ویتامین B12 پوشیده شده در کف چاهک های پلیت میکروتیتر به رقابت می پردازند. هرچه مقدار ویتامین B12 موجود در نمونه بیشتر باشد، جایگاه های بیشتری از آنتی بادی فاز جامد را اشغال می کند. سپس اجزای متصل نشده طی فرآیند شستشو از محیط

خارج و با افزودن محلول سوبسترا - رنگزا و انکوباسیون بمدت ۱۵ دقیقه رنگ آبی ظاهر می شود. با افزودن محلول توقف تولید رنگ متوقف می گردد که شدت جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری می شود. شدت رنگ با مقدار ویتامین B12 موجود در سرم نسبت معکوس دارد

معرف ها :

معرف	۴۸ تستی	۹۶ تستی	آماده سازی
پلیت پوشیده شده با آنتی بادی علیه ویتامین B12	1×48 wells	1×96 wells	آماده مصرف
کالیبراتور۱-۶ (۰، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و,۱۰۰۰ و ۲۰۰۰پیگوگرم در میلی لیتر)در ماتریکس بافر سازگار با سرم انسانی به همراه نگهدارنده کالیبره شده علیه ماده مرجع WHO Standard 03/178	6×0.5 mL	6×1.0 mL	آماده مصرف
نمونه های کنترل تهیه شده در ماتریکس بافر سازگار با سرم انسانی به همراه نگهدارنده (بازه قابل قبول سرم کنترل ها برروی برچسب قید شده است)	2 ×0.5 mL	2 ×1.0 mL	آماده مصرف
رقیق کننده کونژوگه(صورتی رنگ)	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف
کونژوگه آنزیمی غلیظ×11(زرد کهربایی)	1 ×0.75 mL	1 ×1.5 mL	به نسبت ۱ قسمت کونژوگه آنزیمی با ۱۰ قسمت رقیق کننده کونژوگه رقیق گردد (رقت نهایی ×۱۱)
محلول شستشو غلیظ	1 ×30 mL	1 ×30 mL	به نسبت ۱ به ۲۰ با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید
محلول سوبسترا-رنگ زا(تترامتیل بنزدین و آب اکسیژنه)	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول توقف(اسیدکلریدریک ۱ مولار)	1 ×6.0 mL	1 ×6.0 mL	آماده مصرف

یادآوری: محلول سوبسترا-رنگ زا و محلول توقف در کلیه کیت های شرکت پیشگامان سنجش یکسان می باشد

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

۱. سمپلرهای ، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری دقیق. سمپلر ۸ کاناله با قابلیت پیپتینگ ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر و یا دیسپنسر اتوماتیک، اگرچه ضروری نیست ولی باعث بهبود قابل توجه تکرارپذیری و صحت نتایج می گردد.
۲. آب مقطر با هدایت الکتریکی مطلوب کم تر از $1\mu s/cm^3$
۳. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.
۴. کاغذ جاذب رطوبت
۵. دستگاه واشر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر ۸ کاناله یا سرنگ که قادر به ریختن ۳۵۰ میکرولیتر محلول واش 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 یادشده پایدار هستند. ***هرگز فراتر از تاریخ انقضاء مندرج برروی جعبه از کیت استفاده نکنید.***
۲. ***محلول کاری کونژوگه تازه تهیه شده باید ظرف حداکثر ۳۰ دقیقه مصرف شود. اکیداً توصیه می شود کونژوگه کاری به اندازه ای تهیه شده، که در زمان یادشده مصرف شود و مابقی آن دور ریخته شود.***
۳. 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.
۴. از انجماد کیت یا اجزاء کیت خودداری نمایید.

۵. 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.
۶. محلول شستشو باید روزانه و تازه تهیه شود و در همان روز تهیه مصرف شود.
۷. تغییر در خصوصیات فیزیکی معرف ها نظیر وجود ذرات معلق در آنها اغلب حاکی از آلودگی و خرابی معرف ها می باشد.
۸. 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.
۹. کیت های باز شده اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شوند، حداکثر به مدت ۸ هفته پایدار خواهند بود.
۱۰. اجزاء کیت ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابجایی درب معرف ها جلوگیری شود.
۱۱. 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**C**°۲۰- 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.
۵. ویتامین B12 به شدت به تابش نور حساس است و نمونه های سرم هدف سنجش ویتامین B12 باید به دور از تابش مستقیم نور نگهداری شود

احتیاطات و هشدارها

۱. کیت فقط برای تشخیص آزمایشگاهی کاربرد دارد.
۲. کلیه معرف های کیت برای سنجش مستقیم Vitamin B12 سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده اند و برای سنجش Vitamin B12 در سایر مایعات بیولوژیک یا پلاسمای غیر EDTA مناسب نمی باشد.
۳. قبل از آغاز سنجش، دستورالعمل پیش رو را بدقت مطالعه نموده و اطمینان حاصل کنید که تمامی نکات آن را بخوبی فراگرفته اید. همواره از ویرایش معتبر و به روز دستورالعمل که همراه کیت بسته بندی شده است، 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 توقف که حاوی اسید سولفوریک است با پوست جلوگیری شود. در صورت تماس با آب و صابون شستشو داده شود.
۶. 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 طورکامل ایمنی یک نمونه با منشاء انسانی را تضمین نماید، با آن همانند یک نمونه بالقوه عفونی رفتار نمایید.
۷. با کلیه نمونه های بیمار به عنوان نمونه های بالقوه عفونی برخورد نمایید.
۸. برخی از معرف ها حاوی سدیم آزاید و یون سیانید 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 وارهایی پس ماندهای حاوی مواد شیمیایی

سمی (Toxic) مانندفلزات سنگین، فنل، سیانیدها و سدیم آزاید 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. به عنوان مثال با افزودن ۱۹۰ میلی لیتر آب مقطر یا آب دیونیزه به ۱۰میلی لیتر از بافر شستشو غلیظ ۲۰۰ میلی لیر محلول شستشو آماده تهیه کنید.
۳. تهیه محلول کاری کونژوگه: در یک لوله تمیز و ترجیحاً یک بار مصرف ابتدا محلول رقیق کننده کونژوگه و سپس محلول کونژوگه غلیظ ×۱۱ را با نسبت 1:11 اضافه نمایید. به عنوان مثال به ۱ میلی لیتر محلول رقیق کننده کونژوگه ۱۰۰ میکرولیتر کونژوگه ×۱۱ اضافه نمایید. درب ویال را پارافیلم بسته و با چندین بار سروته کردن لوله بخوبی آن را مخلوط نمایید. جدول زیر به عنوان راهنمای تهیه محلول کونژوگه می تواند مورداستفاده قرار گیرد:

رقیق کننده کونژوگه (میلی لیتر)	کونژوگه×۱۱ (میکرولیتر)	تعداد استریپ
۲	۲۰۰	۲
۴	۴۰۰	۴
۶	۶۰۰	۶
۸	۸۰۰	۸
۱۰	۱۰۰۰	۱۰
۱۲	۱۲۰۰	۱۲

یادآوری ۱: به دلیل حساسیت محلول کونژوگه به آلودگی های مختلفی که در اثر شستن لوله های شیشه ای در آزمایشگاه با شوینده ها و سفیدکننده ها حادث می شود، ***قویاً توصیه می شودجهت رقیق سازی از لوله های یک بارمصرف پلاستیکی استفاده شود***.

نکات مهم در انجام تست:

۱. فرایند شستشو از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. شستشوی ناکافی باعث عدم جداشدن پیوندهای غیراختصاصی 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 مقدارVitamin B12 نمونه بیش از2000 pg/mL باشد، نمونه را با استاندارد صفر 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 باشد.
۵. دمای مطلوب محیط آزمایشگاه برای آزمایش های الایزا۲۰ تا۲۷ درجه سانتیگراد می باشد.
۶. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی 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 مورداستفاده قرار گیرد.
۸. جهت پیپت کردن محلول سوبسترا-رنگ زا و محلول توقف از میکروپیپت های حاوی ***قطعات فلزی استفاده نکنید***.

۹. زمان های انکوباسیون و دمای انکوباسیون را با دقت رعایت کنید.
۱۰. در کیت Vitamin B12 شرکت پیشگامان سنجش برای اجتناب از خطای ناشی از اختلاف زمانی بین پیپت کردن نمونه ها و معرف ها، در چاهک های ابتدایی با انتهایی، 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 یا بیش از شش استریپ در هر بار ران نشود.
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 آثار زیانباری بر نتایج نهایی دارد.
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 لازم 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. محلول کاری کونژوگه را طبق دستورالعمل آماده سازی معرف ها تهیه کنید.
۳. ۵۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار به داخل هر چاهک بریزید.
۴. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کاری کونژوگه ، به تمام چاهک ها اضافه کنید.
۵. پلیت را بمدت ۳۰ 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 یک ساعت در دمای اتاق(۲۰-۲۷°C) انکوبه نمایید.
۶. محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را طبق دستورالعمل زیر شستشو دهید:
۶,۱ 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 الرطوبه تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.
۶,۲ بهتراست برای شستشو از دستگاه های اتوماتیک شستشو که قابل برنامه ریزی است استفاده نمایید. که در این صورت به دستورالعمل دستگاه شستشو مراجعه نمایید.
۷. 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.
۸. 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:

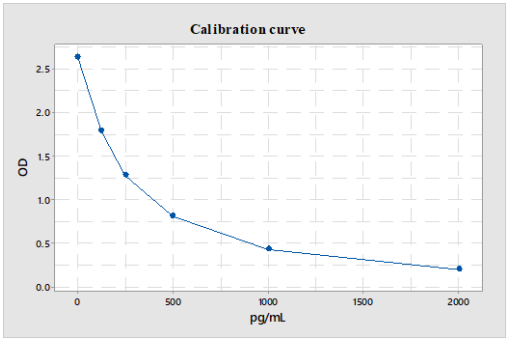
۱. با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها برروی محور عمودی (محور Y) و غلظت مشخص آنها برروی محور افقی(محور X) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد را از طریق ترسیم خطوطی که از که از تمامی نقاط تلاقی عبور کرده باشد،ترسیم کنید.
۲. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا 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 پردازش داده های داخلی است استفاده می کنید، جهت محاسبه نتایج و ترسیم منحنی کالیبراسیون به دستوالعمل دستگاه مراجعه نمایید. برای محاسبه نتایج کیت ویتامین B12 شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس از مد محاسباتی نقطه-به-نقطه(Point-to-point) استفاده کنید.

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 آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید براساس نتایج بدست آمده در آزمایشگاه خویش ترسیم نماید.

VITAMIN B12 (pg/ml)	Absorbance (450nm)
0	2.64
125	1.79
250	1.28
500	0.81
1000	0.43
2000	0.20



کنترل کیفی:

در هر کیت دو نمونه کنترل وجود دارد که مقادیر موردانتظار برای هر یک برروی برچسب ویال درج شده است. علاوه بر کنترل های 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 یادشده لازم به ذکر است که آزمایشگاه باید مقدار هدف و انحراف معیار نتایج و کرانه های بالا(UCL) و پایین(LCL) نمونه های کنترل را خود محاسبه و مبنای برنامه های کنترل کیفی خویش قرار دهد.

بازه مرجع:

از آنجایی که تفاوت هایی بسته به جمعیت و وضعیت رژیم غذایی افراد وجود دارد، توصیه می شود، هر آزمایشگاهی قبل از گزارش نتایج محدوده طبیعی مورداستناد خویش را براساس انتخاب تعداد مناسبی از افراد و طی بازه زمانی مناسب تعیین نماید.

مقادیری که در جدول زیر به نمایش درآمده است، براساس سنجش ویتامین B12 با کیت پیشگامان سنجش ایساتیس بر روی تعدادی از افراد مراجعه کننده به چندین آزمایشگاه تهران بدست آمده است و هر آزمایشگاهی موظف است ابتدا انتقال پذیری این داده ها را درخصوص جمعیت موردنظر خویش راستی آزمایی کرده و درصورت مشاهده ناهمخوانی، بازه مرجع خود را بدست آورد.

N	Median	Range (2.5th- 97.5th percentile)
	Pg/mL	Pg/mL
140	555	160-950

لازم به ذکر است اگرچه افزایش ویتامین B12 در برخی موارد مشاهده شده است، ولی **اهمیت بالینی آن چندان مشخص نیست.**

دامنه مرجع زیر نیز می تواند به عنوان راهنما برای گروه های مختلف سنی مورداستفاده قرار گیرد:

سن بیمار(سال)	محدوده مرجع(pg/mL)	سن بیمار(سال)	محدوده مرجع(pg/mL)
۱-۰	۱۵۰۰-۱۵۹	۱۴-۸	۱۰۴۶-۲۰۱
۲-۱	۱۵۰۰-۲۶۷	۱۹-۱۴	۹۸۰-۱۷۹
۸-۲	۱۰۱۳-۲۵۸	>۱۹	۹۵۰-۱۶۰
۱۹-۱۴	۹۸۰-۱۷۹		

خصوصیات اجرایی کیت

۱- حد پایینی اندازه گیری(Lower limit of measurement) :

حد شاهد(Limit-of-Blank:LOB) و حد آشکارسازی(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 (95th percentile) از ۶۰ بار اندازه گیری برروی نمونه شاهد(استاندارد صفر) طی چندین ران بدست آمد. حد بلانک معادل غلظتی درنظر گرفته شد که ۹۵٪ از ۶۰ نتیجه اندازه گیری های تکراری مقداری کمتر از آن بدست دهد. ، مقدار حد شاهد معادل38 پیکوگرم در میلی لیتر بدست آمد. برای تعیین حد آشکارسازی ۲۰ اندازه گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم(۶۰=۳×۲۰=n) با محتوای, ویتامین B12 حدود ۱۰۰ تا ۱۲۰ پیکوگرم در میلی لیتر سرم که مقدار ویتامین B12 آن به روش مستقل دیگری تعیین شده بود طی سه روز انجام شد و بزرگترین انحراف معیار اندازه گیری های تکراری بر روی سه نمونه یادشده مبنای تعیین حد آشکارسازی قرار گرفت. از رابطه زیر حد آشکارسازی معادل 80 pg/mL تعیین گردید.

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

۲- دقت(Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت ویتامین B12 شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس و۱ انباشته سرمی تهیه شده از نمونه های بیمار و ۲ نمونه کنترلی در نقاط مختلف بازه اندازه گیری(۹۰ تا ۲۰۰۰ پیکوگرم در میلی لیتر) مطابق با راهنمای EP 05-A3 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI) بدست آمد.

به طور خلاصه، طی ۱۰ روزکاری، 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: خلاصه نتایج در جدول زیر آورده شده است:

Sample Description	Mean (pg/mL)	Repeatability		Within-Laboratory Precision	
		SD	%CV	SD	%CV
Control serum	223	13.0	5.83	12.77	5.73
Patient Pool	444	25.5	5.74	24.46	5.51
Control serum	1610	118.7	7.37	103.66	6.44

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 ویتامین B12 پیشگامان سنجش ایساتیس با برخی واکنشگرهای متقاطع 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 شد. سپس مقدار ویتامین B12همزمان در یک ران در نمونه هایی که با ماتریکس بی اثرspike شده بودند و نمونه هایی که با واکنشگرهای متقاطع spike شدند، اندازه گیری شد و مقدار واکنش پذیری متقاطع هر نمونه از رابطه زیر محاسبه شد و به صورت نسبت به غلظت ویتامین B12 اولیه محاسبه شد. نتایج در جدولی که در ادامه می آید خلاصه شده است:

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

نوع ماده	درصد تداخل(٪)
Cyanocobalamin	100%
Methylcobalamin	100%
Deoxyadenosylcobalamin	99%
hydroxylcobalamin	33%
Folic Acid	0%

همچنین اثر تداخلی مداخله گرهای متداول برروی کیت سنجش ویتامین B12 پیشگامان سنجش ایساتیس بررسی گردید، طی این ارزیابی مشخص شدهموگلوبین تا 50 mg/mL و بیلیروبین تا 20 mg/dL و تری گلیسریدها تا 1000 mg/dL تأثیری بر نتیجه سنجش ندارد.

۴- درستی(Trueness)

ارزیابی درستی با مقایسه بین نتایج اندازه گیری کیت سنجش ویتامین B12 شرکت پیشگامان و روش ECLIA برروی سیستم اندازه گیری Cobas E411 مطابق با راهنمای EP 09-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI) برروی هشتاد نمونه بیمار در بازه غلظتی ۱۷۰۰-۸۰ پیکوگرم در میلی لیتر انجام و به روش رگرسیون خطی تحلیل گردید. در این ارزیابی نتایج کیت پیشگامان برروی محور عمودی(محور yها) و نتایج Cobas E411برروی محور افقی(محور xها) مشخص و نمودار رگرسیون خطی ترسیم گردید. خلاصه نتایج در ادامه آورده شده است:

$$Y = 0.992x + 5.354$$

$$r^2 = 0.988$$

۵- خطی بودن(Linearity):

برای ارزیابی خطی بودن یک نمونه با غلظت تقریبی 2000 pg/mL به نسبتهای مختلف با استاندارد صفر رقیق و سپس غلظت ویتامین B12 آن با استفاده از کیت سنجش ویتامین B12 شرکت پیشگامان با سه تکرار برروی هر نمونه اندازه گیری و مقدار خطی بودن براساس نسبت مقدار مشاهده شده(Observed) به مقدار قابل انتظار (Expected) که از طریق محاسبه برمبنای ضریب رقت تعیین گردیده بود ،برحسب درصد محاسبه گردید($\frac{observerd}{expected} \times 100$)که نتایج در جدول زیر خلاصه شده است(مقدار قابل قبول۲۰±۱۰۰)

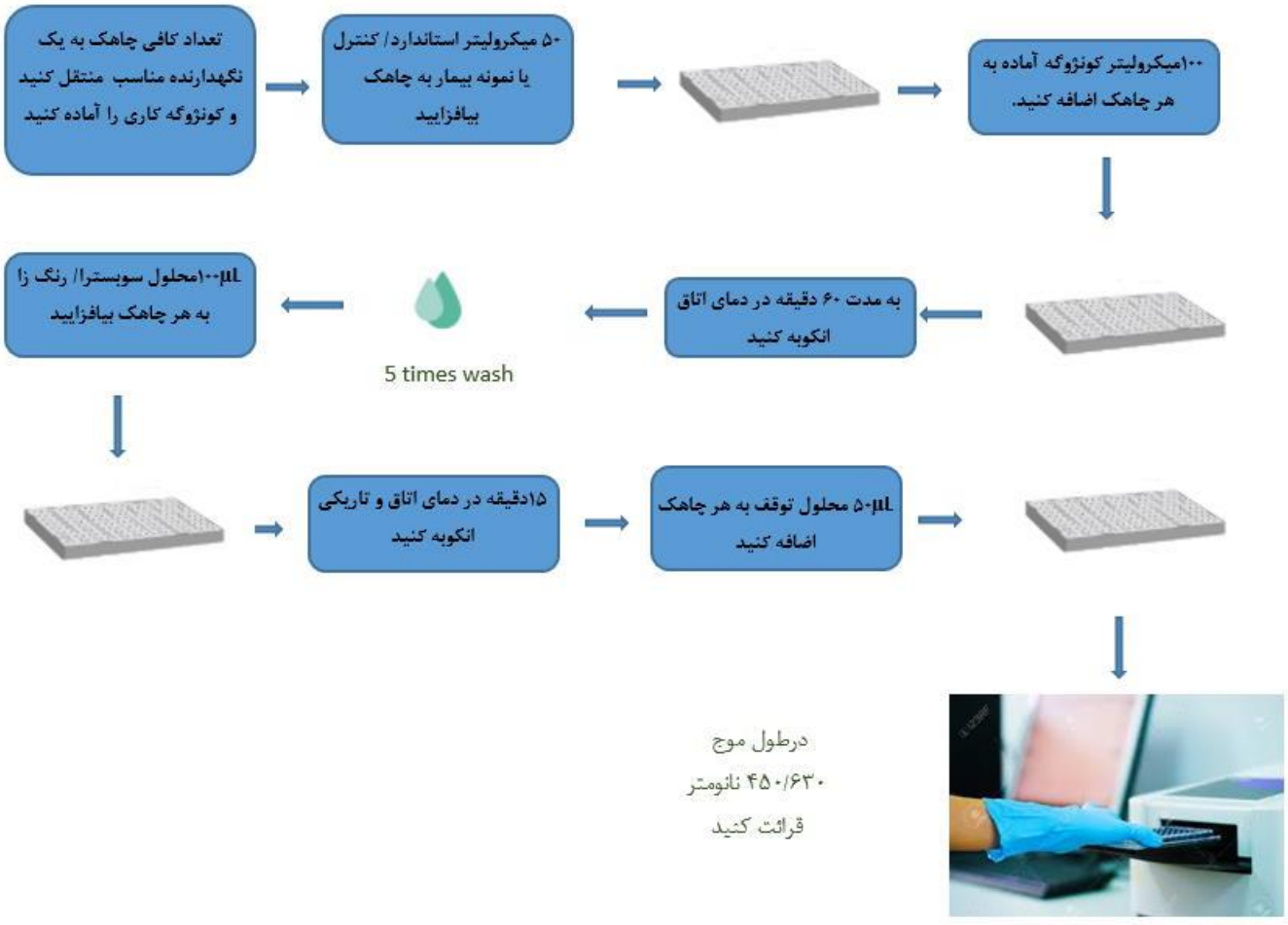
Dilution factor	Observed Concentration (pg/mL)	Expected Concentration (pg/mL)	Recovery(%)	(%)Bias
1	2000	2000	100	NA*
0.75	1428	1500	95.2	-4.8
0.5	1072	1000	107.2	7.2
0.25	496	500	99.2	-0.8
0.1	194	200	97	-3
0.05	105	100	105	5
0.01	18.7	20	93.5	-6.5
0	0	0	NA	NA

*NA: کاربردی ندارد

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. Pagana K.D. et al. (2018). Mosby's Manual of diagnostic and Laboratory tests.6th ed. (pp. 460-1). Elsevier Inc.
5. Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics. (pp. 669-674). 6th ed. Elsevier Inc.
6. Stabler SP. Vitamin B12 deficiency. N Engl J Med 2013;368:149-160
7. Wahlin A, et. Al. Reference values for serum levels of vitamin B12 and folic acid in population-based sample of adults between 35 and 80 years of age. Public Health Nutr. 2002;5(3):505-511

خلاصه روش


تعداد کافی چاهک به یک نگهدارنده مناسب منتقل کنید و کونژوگه کاری را آماده کنید
۵۰ میکرولیتر استاندارد/ کنترل یا نمونه بیمار به چاهک بیافزایید
۱۰۰میکرولیتر کونژوگه آماده به هر چاهک اضافه کنید.
به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید
5 times wash
۱۰۰µLمحلول سوبسترا/ رنگ زا به هر چاهک بیافزایید
۱۵دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید
۵۰µL محلول توقف به هر چاهک اضافه کنید
درطول موج
۴۵۰/۶۳۰ نانومتر
قرائت کنید

خطایابی 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	دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید قبل از شروع آزمایش کیت و نمونه بیماران به دمای اتاق برسد
	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید
	طول موج خوانش نامناسب (۴۰۵ nm بجای ۴۵۰ nm)	تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید طول موج دستگاه را دوباره چک کنید
صحیح نبودن نمودار استانداردها	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید
	پیپتینگ نامناسب	استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود
	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید 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	عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید تمام سوزن های دستگاه واشر را چک کنید
	طول موج نامناسب در خوانش	تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید طول موج دستگاه را دوباره چک کنید 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
	پیپتینگ نامناسب، گرفتگی لوله داخلی سمپلر بواسطه آلودگی	استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نشود

عدم تکرار پذیری مناسب		توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد 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