

IVD-REF: PS – Vit B12	 پیشگامان سنجش پیمانکاران خدمات تشخیصی و تست‌های پزشکی	کیت الایزا Vitamin B12 نام
Ver. No: 06		سرم Vitamin B12 ELISA KIT

آماده سازی	۹۶ تستی	۴۸ تستی	معرف
آماده مصرف	1×96 wells	1×48 wells	پلیت پوشیده شده با آنتی بادی علیه ویتامین B12
آماده مصرف	5×1.0 mL	5×0.5 mL	کالیبراتور ۱-۵ (۰، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پیگروگرم در میلی لیتر) در ماتریکس بافر سازگار با سرم انسانی به همراه نگهدارنده کالیبره شده علیه ماده مرجع WHO Standard 03/178
آماده مصرف	2 ×1.0 mL	2 ×0.5 mL	نمونه های کنترل تهیه شده در ماتریکس بافر سازگار با سرم انسانی به همراه نگهدارنده (بازه قابل قبول سرم کنترل ها بر روی برچسب قید شده است)
آماده مصرف	1 ×12.0 mL	1 ×6.0 mL	رقیق کننده کونژوگه (صورتی رنگ)
به نسبت ۱ قسمت کونژوگه آنزیمی با ۱۰ قسمت رقیق کننده کونژوگه رقیق گردد (رقت نهایی ۱×۱)	1 ×1.5 mL	1 ×0.75 mL	کونژوگه آنزیمی غلیظ X11 (زرد کهربایی)
به نسبت ۱ به ۱۹ با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید	1 ×30 mL	1 ×30 mL	محلول شستشو غلیظ
آماده مصرف	1 ×12.0 mL	1 ×6.0 mL	محلول سوبسترا-رنگ زا (تترامتیل بنزدین و آب اکسیژنه)
آماده مصرف	1 ×6.0 mL	1 ×6.0 mL	محلول توقف (اسید کلریدریک ۱ مولار)

IVD-REF: PS – Vit B12	 پیشگامان سنجش پایشگاه‌های تشخیص‌دهی و تست‌های تشخیصی	کیت الایزا Vitamin B12 نام
Ver. No: 06		سرم Vitamin B12 ELISA KIT

کاربرد:

کیت Vitamin B12 ELISA شرکت پیشگامان سنجش ایستاتیس 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 میکروارگانیزم 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 اتوایمون معده می باشد. بنا به دلایل تاریخی بیماری ناشی از کمبود شدید ویتامین B12، آنمی کشنده (Pernicious Anemia) نامیده می شود، هرچند تظاهرات عصبی ناشی از کمبود ویتامین B12. بارزتر از سایر یافته های بالینی 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) نقش بسیار مهمی در فعالیت دو آنزیم متیونین سنتاز و متیل مالونیل کوآ- مواتز دارد. جایگاه متیونین سنتاز در سیتوپلاسم است و به ویتامین B12 به فرم متیل کوبالامین نیاز دارد و تبدیل هموسیستتین 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 مواتز که متیل مالونیل کوآ را به سوکسینیل کوآ تبدیل می کند نیز ضروری است. این واکنش مرحله ای در اکسیداسیون اسیدهای چرب فرد زنجیره و سوخت و ساز اسیدهای آمینه مولد اجسام کتون 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.

IVD-REF: PS – Vit B12	 پیشگامان سنجش آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و آنتی‌ژن‌شناسی	کیت الایزا Vitamin B12 نام
Ver. No: 06		سرم Vitamin B12 ELISA KIT

شیوع کمبود ویتامین B12 در جمعیت‌های فقیر بسیار شایع می‌باشد و شیوع آن با افزایش سن، بیشتر می‌شود. کمبود ویتامین B12 بر ساخت گویچه‌های قرمز خون اثر گذاشته و منجر به آنمی مگالوبلاستیک ناشی از ناهنجاری در ساخت DNA می‌گردد. علاوه بر آن عملکرد عصبی را به دلیل میلین زدایی ناشی از ناهنجاری متیلاسیون در رشته‌های عصبی دچار اشکال کرده و باعث آسیب اعصاب محیطی، زوال عقل، نقصان اعمال شناختی و افسردگی می‌گردد. سایر آثار کمبود ویتامین B12 شامل افزایش خطر نقایص طناب عصبی، پوکی استخوان، بیماری‌های قلبی-عروقی و مغزی-عروقی می‌باشد. تشخیص سریع کمبود ویتامین B12 به دلیل ماهیت نهفته اختلال و خطر آسیب‌های پایدار مغزی بسیار حیاتی است.

متداول‌ترین روش تشخیص کمبود ویتامین B12، اندازه‌گیری سطح ویتامین B12 سرم است. اندازه‌گیری سایر شاخص‌های بیولوژیک به ویژه اسید متیل مالونیک (MMA) و سایر آنالیت‌ها نظیر فولات، و هموسیستین، و هولوترانس کوبالامین (ویتامین B12 فعال) به تشخیص بهتر کمبود ویتامین B12 کمک می‌کند.

اصول آزمایش :

مبنای کیت سنجش ویتامین B12 شرکت تولیدی-تحقیقاتی پیشگامان سنجش ایستایس بر پایه الایزای رقابتی می‌باشد. در این روش، ویتامین B12 موجود در سرم یا کالیبراتور/کنترل پس از استخراج و جداسازی از پروتئین‌های سرم، با ویتامین B12 کونژوگه با آنزیم HRP برای اتصال به آنتی بادی مونوکلونال علیه ویتامین B12 پوشیده شده در کف چاهک‌های پلیت میکروتیتر به رقابت می‌پردازند. هرچه مقدار ویتامین B12 موجود در نمونه بیشتر باشد، جایگاه‌های بیشتری از آنتی بادی فاز جامد را اشغال می‌کند. سپس اجزای متصل نشده طی فرآیند شستشو از محیط خارج و با افزودن محلول سوبسترا - رنگزا و انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه رنگ آبی ظاهر می‌شود. با افزودن محلول متوقف‌گر، واکنش آنزیمی متوقف می‌گردد و در نهایت شدت جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. شدت رنگ تولید شده با مقدار ویتامین B12 موجود در سرم نسبت معکوس دارد.

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 می‌گردد.
۲. آب مقطر با هدایت الکتریکی مطلوب کم‌تر از $1\mu\text{S}/\text{cm}$
۳. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.
۴. کاغذ جاذب رطوبت

IVD-REF: PS – Vit B12	 پیشگامان سنجش آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و سنجش‌های تخصصی	کیت الایزا Vitamin B12 نام
Ver. No: 06		سرم Vitamin B12 ELISA KIT

۵. دستگاه و اشتر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر ۸ کاناله یا سرنگ که قادر به ریختن ۳۵۰ میکرولیتر محلول شستشو باشد.

نگهداری کیت :

۱. کیت پس از تحویل باید در دمای ۲-۸ 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
۲. هرگز فراتر از تاریخ انقضاء مندرج برروی جعبه از کیت استفاده نکنید.
۳. محلول کاری کونزوگه تازه تهیه شده باید ظرف حداکثر ۳۰ دقیقه مصرف شود. اکیداً توصیه می شود کونزوگه کاری به اندازه ای تهیه شده، که در زمان یادشده مصرف شود و مابقی آن دور ریخته شود.
۴. 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.
۵. از انجماد کیت یا اجزاء کیت خودداری نمایید.
۶. 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.
۷. محلول شستشو باید روزانه و تازه تهیه شود و در همان روز تهیه مصرف شود.
۸. تغییر در خصوصیات فیزیکی معرف ها نظیر وجود ذرات معلق در آنها اغلب حاکی از آلودگی و خرابی معرف ها می باشد.
۹. محلول سوپسترا-رنگ را باید بی رنگ باشد. وجود رنگ آبی در این محلول نشان از خرابی و آلودگی آن دارد و باید دور ریخته شود.
۱۰. کیت های باز شده اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شوند، حداکثر به مدت ۸ هفته پایدار خواهند بود.
۱۱. اجزاء کیت ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابجایی درب معرف ها جلوگیری شود.
۱۲. استفاده از سر سمپلر یکبار مصرف برای دقت و صحت و پرهیز از آلودگی برای برداشتن نمونه ها استاندارد است و کنترل ها ضروری است.

IVD-REF: PS – Vit B12	 پیشگامان سنجش پودمانهای تخصصی و تشخیصی	کیت الایزایز Vitamin B12 نام
Ver. No: 06		سرم Vitamin B12 ELISA KIT

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

۱. سرم یا پلاسما 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 20°C - 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 طبی آزمایشگاهی کاربرد دارد.
۲. کلیه معرف های کیت برای سنجش مستقیم Vitamin B12 سرم یا پلاسما EDTA استاندارد شده اند و برای سنجش Vitamin B12 در سایر مایعات بیولوژیک یا پلاسما 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 فرا گرفته اید. همواره از ویرایش معتبر و به روز دستورالعمل که همراه کیت بسته بندی شده است، استفاده کنید.
۴. کلیه جوانب ایمنی در اجرای 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 و تکنیک 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 کلریدریک 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

IVD-REF: PS – Vit B12	 پیشگامان سنجش آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و سیتوپاتولوژی	کیت الایزایز Vitamin B12 نام
Ver. No: 06		سرم Vitamin B12 ELISA KIT

هیچ آزمایشی نمی تواند به طور کامل 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) مانند فلزات سنگین، فتل، 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.

۹. این کیت به روش دستی (غیر دستگاهی) می باشد، برای انجام تست با روش دستگاهی با کارشناسان فنی این شرکت تماس حاصل نمایید.

آماده سازی معرف ها:

۱. همه معرف ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (۲۷-۲۰ درجه 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 ۱۰ میلی 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 پارافیلیم بسته و با چندین بار سروته کردن لوله بخوبی آن را مخلوط نمایید. جدول زیر به عنوان راهنمای تهیه محلول کونژوگه می تواند مورد استفاده قرار گیرد:

IVD-REF: PS – Vit B12	 پیشگامان سنجش آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و سنجش	کیت الایزا Vitamin B12 نام
Ver. No: 06		سرم Vitamin B12 ELISA KIT

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

یادآوری ۱: به دلیل حساسیت محلول کونزوگه 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 شود جهت رقیق سازی از لوله های یک بار مصرف پلاستیکی استفاده شود.

نکات مهم در انجام تست:

۱. فرایند شستشو از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. شستشوی ناکافی باعث عدم جدا شدن 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 مقدار Vitamin B12 نمونه بیش از 1000 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 الایزا ۲۰ تا ۲۷ درجه سانتیگراد می باشد.
۶. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.
۷. بهتر است 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 مورد استفاده قرار گیرد.
۸. جهت پیت 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.

IVD-REF: PS – Vit B12	 پیشگامان سنجش آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و تشخیص‌های تخصصی	کیت الایزا Vitamin B12 نام
Ver. No: 06		سرم Vitamin B12 ELISA KIT

۱۰. جهت اجتناب از بروز خطا در آزمایش، به دلیل اختلاف زمانی پیپت کردن نمونه ها و معرف ها، در چاهک ها، پیپتینگ چاهک ها با محلول کونژوگه نباید بیشتر از ۵ دقیقه به طول بیانجامد. لذا توصیه می شود، در صورتی که 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 باعث نتایج کاذب می گردد.

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 بر روی 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 به مدت 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 نمایید.
- ۶/۲. بهتر است برای شستشو از دستگاه های اتوماتیک شستشو که قابل برنامه ریزی است استفاده نمایید. که در این صورت به دستورالعمل دستگاه شستشو مراجعه نمایید.

IVD-REF: PS – Vit B12	 پیشگامان سنجش آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و تشخیص مولکولی	کیت الایزا Vitamin B12 نام
Ver. No: 06		سرم Vitamin B12 ELISA KIT

۷. ۱۰۰ میکرولیتر از سوپسترا-رنگ را آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید.

۸. ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همان ترتیبی که محلول سوپسترا رنگ 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 نمایید (در صورت امکان از طول موج ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید).

محاسبه نتایج:

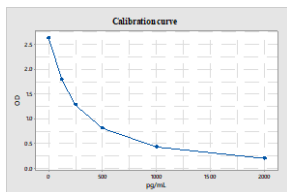
۱. با استفاده از میانگین جذب نوری استاندارد ها بر روی محور عمودی (محور Y) و غلظت مشخص آنها بر روی محور افقی (محور X) بر روی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد را از طریق ترسیم خطوطی که از تمامی نقاط تلاقی عبور کرده باشد، ترسیم کنید.
۲. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا 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 دستورالعمل دستگاه مراجعه نمایید. برای محاسبه نتایج کیت ویتامین B12 شرکت پیشگامان سنجش ایستاس از مدل 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.

IVD-REF: PS – Vit B12	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیصات سنجشی و ایمنی‌شناسی	کیت الایزای Vitamin B12 نام
Ver. No: 06		سرم Vitamin B12 ELISA KIT

ROW	(pg/ml)	OD
1	0	2.64
2	125	1.79
3	250	1.28
4	500	0.81
5	1000	0.43



کنترل کیفی:

در هر کیت دو نمونه کنترل وجود دارد که مقادیر مورد انتظار برای هر یک بر روی 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 مورد استناد 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 ایستاتیس 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 در خصوص جمعیت مورد نظر خویش راستی آزمایی کرده و در صورت مشاهده ناهمخوانی، بازه مرجع خود را بدست آورد.

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 مورد استفاده قرار گیرد:

IVD-REF: PS – Vit B12	 پیشگامان سنجش پراکنش‌دهنده آزمایشگاه‌های تشخیص طبی	کیت الایزا Vitamin B12 نام
Ver. No: 06		سرم Vitamin B12 ELISA KIT

محدوده مرجع (pg/mL)	سن بیمار (سال)
۲۰۰-۸۴۰	بزرگسالان
۱۶۰-۱۰۰۰	نوزادان

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 ۹۵ام (95th percentile) از ۶۰ بار اندازه گیری بر روی نمونه شاهد (استاندارد صفر) طی چندین ران بدست آمد. حد بلانک معادل غلظتی در نظر گرفته شد که ۹۵٪ از ۶۰ نتیجه اندازه گیری های تکراری مقداری کمتر از آن بدست آید. مقدار حد شاهد معادل 38 پیکوگرم در میلی لیتر بدست آمد. برای تعیین حد آشکارسازی ۲۰ اندازه گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم ($n=20 \times 3=60$) 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 ایستایس و^۱ 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 روز کاری، سه کاربر و هر یک روزانه سه ران اندازه گیری های تکراری به صورت دوتایی در هر ران بر روی نمونه های یاد شده انجام دادند ($2 \times 3 \times 3 \times 10$). نتایج با روش آماری Fully nested ANOVA تحلیل گردید: خلاصه نتایج در جدول زیر آورده شده است:

IVD-REF: PS – Vit B12	 پیشگامان سنجش آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و میکروبیولوژی	کیت الایزا Vitamin B12 نام
Ver. No: 06		سرم Vitamin B12 ELISA KIT

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 ایستاتیس 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 B12 همزمان در یک ران در نمونه هایی که با ماتریکس بی اثر spike 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:

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

نوع ماده	درصد تداخل (%)
Cyanocobalamin	100%
Methyl cobalamin	100%
Deoxy-adenosyl cobalamin	99%
hydroxyl cobalamin	33%
Folic Acid	0%

IVD-REF: PS – Vit B12	 پیشگامان سنجش آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و تشریحی	کیت الایزا Vitamin B12 نام
Ver. No: 06		سرم Vitamin B12 ELISA KIT

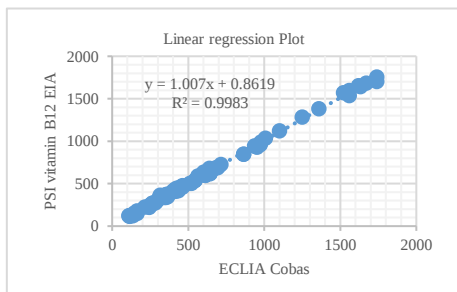
همچنین اثر تداخلی مداخلة گزهای متداول بر روی کیت سنجش ویتامین B12 پیشگامان سنجش ایستاتیس بررسی گردید، طی این ارزیابی مشخص شده موگلوبین تا 50 mg/mL و بیلیروبین تا 20 mg/dL و تری گلیسریدها تا 1000 mg/dL تأثیری بر نتیجه سنجش ندارد.

۴- درستی (Trueness)

ارزیابی درستی با مقایسه بین نتایج اندازه گیری کیت سنجش ویتامین B12 شرکت پیشگامان و روش ECLIA بر روی سیستم اندازه گیری Cobas E411 مطابق با راهنمای EP 09-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) بر روی هشتاد نمونه بیمار در بازه غلظتی ۸۰-۱۷۰۰ پیکوگرم در میلی لیتر انجام و به روش رگرسیون خطی تحلیل گردید. در این ارزیابی نتایج کیت پیشگامان بر روی محور عمودی (محور Y) و نتایج Cobas E411 بر روی محور افقی (محور X) 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 بر روی هر نمونه اندازه گیری و مقدار خطی بودن براساس نسبت مقدار مشاهده شده (Observed) به مقدار قابل انتظار

IVD-REF: PS – Vit B12	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص‌های و تست‌های	کیت الایزای Vitamin B12 نام
Ver. No: 06		سرمد Vitamin B12 ELISA KIT

(Expected) که از طریق محاسبه بر مبنای ضریب رقت تعیین گردیده بود، برحسب درصد محاسبه گردید ($\frac{observed}{expected} \times 100$) که نتایج در جدول زیر خلاصه شده است (مقدار قابل قبول 100 ± 20)

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

IVD-REF: PS – Vit B12	 پیشگامان سنجش آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و آنتی‌بیوتیک‌ها	کیت الایزای Vitamin B12 نام
Ver. No: 06		سرم Vitamin B12 ELISA KIT

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

IVD-REF: PS – Vit B12	 پیشگامان سنجش پخشگاه تخصصی و تشخیصی	کیت الایزا Vitamin B12 نام
Ver. No: 06		سرم Vitamin B12 ELISA KIT

خطایابی در آزمایش های الایزا

نوع مشکل	علت مشکل	راه حل
پایین بودن OD استانداردها و نمونه ها	افت و یا آلودگی کونزوگه	تکرار تست با کونزوگه جدید
	پایین بودن دما و یا کوتاه بودن زمان انکوباسیون، به دما نرسیدن محلولهای کیت و نمونه بیماران	۱. دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید. ۲. 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	۱. PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲. پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	۱. پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. ۲. پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.
	طول موج خوانش نامناسب (۴۰۵nm بجای ۴۵۰nm)	۱. تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. ۲. طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
صحیح نبودن نمودار استانداردها	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید.
	پیپتینگ نامناسب	۱. استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف ۲. از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید. ۳. توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. ۴. توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود.

IVD-REF: PS – Vit B12	 پیشگامان سنجش پویانگه‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الایز Vitamin B12 نام
Ver. No: 06		سرم Vitamin B12 ELISA KIT

۱. PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید.	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer.	بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD
۲. پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.	شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	
تکرار تست با استاندارد های جدید	آلودگی استاندارد صفر	
استفاده از محلول رنگزا جدید	آلودگی محلول رنگزا	
۱. عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید.	آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نامناسب	
۲. تمام سوزن های دستگاه واشر را چک کنید.		عدم تولید رنگ در چاهک ها
۱. تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید.	طول موج نامناسب در خوانش	
۲. طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.		
۳. از فیلتر ۰۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید.	آلودگی محلول Stop	
تکرار تست با محلول Stop جدید	استفاده از مواد سایر کیت ها	
تکرار تست با مواد همان کیت	انجام نشدن مرحله ای از تست	عدم تولید رنگ در چاهک ها
تکرار تست	آلودگی محلول رنگزا	
تکرار تست با محلول رنگزا جدید	آلودگی محلول کونزوگه با سدیم آزاید	
تکرار تست با محلول کونزوگه جدید		
۱. استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف	پیپتینگ نامناسب، گرفتگی	
۲. از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید	لوله داخلی سمپلر بواسطه	
۳. توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد.	آلودگی	

IVD-REF: PS – Vit B12	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه تخصصی و تشخیصی	کیت الایزای Vitamin B12 نام
Ver. No: 06		سرم Vitamin B12 ELISA KIT

۴. توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نشود. ۵. توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد. ۶. کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلر ها		عدم تکرار پذیری مناسب
فاصله زمانی بین اضافه کردن استاندارد ها و نمونه نباید بیشتر از ۱۰ دقیقه باشد. در این صورت نتایج قابل اعتماد نیست.	طولانی شدن زمان انجام تست	
پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید.	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	
پیپتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.	باقی ماندن کوئژوگه در لبه چاهکها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک ها	
در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک ها نباشد.	وجود حباب در چاهک ها	
کف چاهکها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید.	کثیف بودن کف چاهکها	
قبل از استفاده، ویال محلول ها را به آرامی تکان دهید.	مخلوط نشدن محلول های کیت	