ایده آل تشخیص آتیه

کیت اندازه‌گیری Folate در سرم انسان
Folate ELISA Kit 96t
Cat. No: 6524-96 / Rev: E7 (1405/07/07)

مقدمه:
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 هموليتيک 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) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
۲) کالیبراتورهای (Folate Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های ۰، ۱، ۳، ۹، ۱۸ و ۳۰ ng/mL.
۳) کونژوگه آنزیمی (Folate Enzyme Conjugate): یک ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌ژن متصل به آنزیم HRP در بافر.
۴) کونژوگه بیوتینی (Folate Biotin Conjugate): یک ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی بیوتینیله در بافر.
۵) محلول آزادکننده (Folate Releasing Agent): یک ویال ۱۳ میلی‌لیتری.
۶) محلول پایدارکننده (Folate Stabilizing Agent): یک ویال ۰/۷ میلی‌لیتری.
۷) بافر خنثی‌کننده (Folate Neutralizing Buffer): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۸) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
۹) محلول رنگزا (Substrate Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۱۰) محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop Solution) : یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۱۱) محلول کنترل (Folate Control): ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری.
۱۲) برچسب مخصوص پلیت: یک ورق.
توجه ۱: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.
توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در COA درج گردیده است.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند:
۱) دستگاه خوانش‌گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
۲) سمپلر کالیبره.
۳) آب مقطر دیونیزه.

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 کنید.
۲) تمام محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.
۳) توجه فرمایید که محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
۴) محتویات این کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2، HBsAg و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین با توجه به احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شوند.
۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است و 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 کنید.
۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:
۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم است. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
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.
۳) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۲ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا ۷ روز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.

آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:
۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی 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.
۲) آماده‌سازی محلول استخراج: محلول‌های پایدارکننده و آزادکننده را با نسبت ۱:۳۹ مخلوط نمایید (به‌عنوان مثال، ۱۰۰ میکرولیتر محلول پایدارکننده به ۳/۹ میلی‌لیتر محلول آزادکننده اضافه نمایید) توصیه می‌شود که این محلول قبل از مصرف و به مقدار نیاز تهیه شود.
۳) 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 ۵۰µl 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: نگهداری نمونه های Folate در لوله های تیره انجام شود.

توجه: جهت استفاده از کیت در دستگاه الایزا پروسسور پیشنهاد می‌شود حجم استفاده از ترکیبات جهت استخراج دو برابر شود (۲۰۰ لاندا نمونه +۱۰۰ لاندا محلول استخراج + ۱۰۰ لاندا محلول ختثی کننده).

روش انجام آزمایش:
قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، کنترل‌ها و نمونه‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت کنید.
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 نگهداری کنید.
۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، کنترل و نمونه‌های استخراج شده را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.
۳) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید.
۴) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه بیوتینی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید.
۵) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
۶) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا آسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده، (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت[1] اقدام نمایید.
۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری نمایید.
توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به‌دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۵ دقیقه افزایش دهید.
۸) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید تا رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

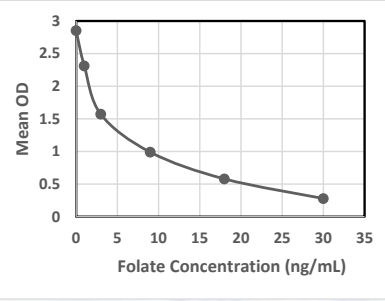
1. http://www.idealdiag.com/Training.aspx

ISO13485 KGS

۹) مقدار جذب نوری را برای هر چاهک در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول‌موج رفرانس ۶۳۰-۶۲۰ نانومتر استفاده کنید).

در این آزمایش محاسبه غلظت به روش Point to Point و 4PL (یا Logit-log) قابل اجرا است؛ در صورت استفاده از روش 4PL غلظت کالیبراتور A را عددی کوچک (به‌عنوان مثال 0.01 ng/mL) در نظر بگیرد. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه ارائه شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (ng/mL)
Cal. A	A1	2.803	2.850	0
	B1	2.897		
Cal. B	C1	2.272	2.310	1
	D1	2.348		
Cal. C	E1	1.540	1.570	3
	F1	1.600		
Cal. D	G1	0.962	0.990	9
	H1	1.018		
Cal. E	A2	0.555	0.580	18
	B2	0.605		
Cal. F	C2	0.263	0.280	30
	D2	0.297		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای Folate

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.

Normal Range (ng /mL)	
Male	4.5 - 32.2 (ng/mL)
Female	4.8 – 37.3 (ng/mL)
1 ng/mL = 2.266 nmol/L	

پارامترهای کنترل کیفی

۱) بررسی دقت-آزمون دقت درون‌دور (Within Run)

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت و سه سطح کنترل در یک نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV<12% است.

Sample/ Control	1	2	3	Ctrl. 1	Ctrl. 2	Ctrl. 3
No. of Repeats	20	20	20	20	20	20
Mean (ng/mL)	2.80	9.08	24.00	2.98	10. 2	28.14
SD (ng/mL)	0.16	0.44	1.2	0.14	0.47	1.3
CV (%)	5.7	4.8	5.0	4.7	4.6	4.6

۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین‌دور (Between Run)

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت و سه سطح کنترل در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV<12% است.

Sample/ Control	1	2	3	Ctrl. 1	Ctrl. 2	Ctrl. 3
No. of Repeats	20	20	20	20	20	20
Mean (ng/mL)	2.24	7.44	21.84	2.10	6.14	26.05
SD (ng/mL)	0.13	0.38	1.13	0.11	0.30	1.41
CV (%)	5.8	5.1	5.1	5.2	4.8	5.4

۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و سطح Folate در ترکیب به‌دست آمده اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش، Bias<19.20% نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	% Rec.
1	5.35	10.25	7.80	7.79	99.8
2	24.07	5.35	14.71	14.97	101.7
3	10.25	24.07	17.16	17.31	100.8

۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (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	5.46	-1.8	2.4	-2.1	-1.9
2	10.22	-3.1	-1.3	2.4	-2.3
3	21.18	2.6	-1.9	2.7	-2.1

۵) بررسی درستی- مقایسه روش‌ها (Comparison of Methods)

جهت بررسی درستی نتایج این کیت، میزان Folate در ۱۰۰ نمونه سرم با مقادیر پایین، نرمال و بالا اندازه‌گیری شد و نتایج آن با کیت مرجع مقایسه و ضریب همبستگی بین نتایج به‌دست‌آمده از دو کیت، بر اساس روش پیرسون، ۰/۹۹۵ محاسبه گردید. معیار پذیرش برای این آزمایش به صورت زیر تعریف شده است:

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

۶) بررسی تداخلات (Interference)

بر اساس فرمول زیر، درصد تداخلات رایج در سنجشFolate مورد ارزیابی قرار گرفت:

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

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده هموگلوبین تا ۲۵۰، بیلی‌روبین تا ۱۵ و تری‌گلیسرید تا ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر تأثیری بر نتیجه سنجش ندارد.

۷) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) وLimit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با ۰/۵۲ ng/mL تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645\ SDs$$
$$LOB = Meanb + 1.645\ SDb$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

۸) بررسی پایداری (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.

علائم استفاده شده در برچسب کالاها

EC REP	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	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
	Date of manufacture

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 خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

توجه: چنانچه از دستگاه‌های الایزا پروسسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.

دفتر مرکزی: تهران - بزرگراه آیشناسان - سردارجنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۸
کارخانه: کرج - کمالشهر، شهرک صنعتی بهارستان، انتهای گلستان دوم غربی، پلاک ۱۱ تلفن: ۲۳-۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹.