

مقدمه:

فولات (Folate) که به عنوان ویتامین B9 نیز شناخته می شود در فرایندهای زیستی متعدد و مهمی مانند سنتز اسیدهای نوکلئیک، رشد لوله عصبی جنین و عملکرد طبیعی سلول های 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 سلول ها در دریافت فولات مختل می شود 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 الکلی ها و بیماری های سلیاک و کرون مشاهده می شود. سطوح افزایش یافته سرمی فولیک اسید ممکن است در بیماران با آنمی وخیم دیده شود. حیطه کاربرد این کیت اندازه گیری غلظت فولات در سرم انسان می باشد.

اصول آزمایش:

این تست بر پایه الایزای رقابتی طراحی شده است. بی حرکت سازی کمپلکس های ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در کف چاهک و آنتی بادی بیوتینیل شده صورت می پذیرد. نمونه های سرم و کالیبراتور (حاوی آنتی ژن آزاد و غیر کونژوگه)، فولات کونژوگه با آنزیم HRP و آنتی بادی بیوتینیل شده ضد فولات به چاهک ها اضافه می شوند. آنتی ژن ها برای اتصال به آنتی بادی ضد فولات بیوتینیل شده که به استرپتاویدین کف چاهک متصل شده است با یکدیگر رقابت می کنند. پس از تخلیه و شستشوی چاهک، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی تولید می شود که بیشترین میزان جذب نوری را در طول موج 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 (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
- ۲) کالیبراتورهای (Folate Cal A-F): شش ویال با غلظت های ۰، ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۲۵ ng/mL.
- ۳) کونژوگه آنزیمی (Folate Enzyme Conjugate): یک ویال ۶ میلی لیتری حاوی آنتی ژن متصل به آنزیم HRP در بافر.

- ۴) کونژوگه بیوتینی (Folate Biotin Conjugate): یک ویال ۶ میلی لیتری حاوی آنتی بادی بیوتینیل در بافر.
 - ۵) محلول آزادکننده (Folate Releasing Agent): یک ویال ۱۳ میلی لیتری.
 - ۶) محلول پایدارکننده (Folate Stabilizing Agent): یک ویال ۰/۷ میلی لیتری.
 - ۷) بافر خنثی کننده (Folate Neutralizing Buffer): یک ویال ۶ میلی لیتری.
 - ۸) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی لیتری.
 - ۹) محلول رنگزا (Substrate Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری.
 - ۱۰) محلول متوقف کننده واکنش (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری.
 - ۱۱) محلول کنترل (Folate Control): ویال (های) ۰/۵ میلی لیتری.
 - ۱۲) برجسب مخصوص پلیت: یک ورق.
- توجه ۱: کلیه محلول ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده 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 نمی باشند:

- ۱) دستگاه خوانش گر 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 کیت ها و یا شماره های ساخت دیگر جداً خودداری کنید.
- ۲) تمام محلول ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول هایی که تاریخ انقضاء آن ها گذشته است استفاده نکنید.
- ۳) توجه فرمایید که محلول ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- ۴) محتویات این کیت با منشأ انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2 و HCV بررسی شده اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری زا با استفاده از روش های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین با توجه به احتمال آلودگی و بیماری زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل های 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، کنترل ها، چاهک ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع آوری، آماده سازی و نگهداری نمونه:

- ۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم است. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه گیری در درستی نتایج به دست آمده تأثیر گذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
- ۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین ($>5 \text{ mg/day}$) را دریافت می کنند، نمونه گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.
- ۳) درب ظرف نمونه ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه ها تا ۲ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و حداکثر تا ۷ روز در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه ها خودداری کنید.

آماده سازی و نگهداری معرف ها:

- ۱) آماده سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.
- ۲) آماده سازی محلول استخراج: محلول های پایدارکننده و آزادکننده را با نسبت ۱:۳۹ مخلوط نمایید (به عنوان مثال، ۱۰۰ میکرو لیتر محلول پایدارکننده به ۳/۹ میلی لیتر محلول آزادکننده اضافه نمایید) توصیه می شود که این محلول قبل از مصرف و به مقدار نیاز تهیه شود.
- ۳) استخراج نمونه، کنترل و کالیبراتورها: به تعداد نمونه های بیمار، کالیبراتورها و کنترل لوله آزمایش شیشه ای تهیه نمایید. به هر لوله ۱۰۰ از نمونه، کنترل و یا کالیبراتور و ۵۰ از محلول استخراج آماده مصرف اضافه کرده و پس از مخلوط کردن (سه بار ورتکس هر بار به مدت ۱ تا ۲ ثانیه) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید. سپس ۵۰۰ بافر خنثی کننده اضافه کنید. لوله ها را پس از مخلوط کردن (سه بار ورتکس هر بار به مدت ۱ تا ۲ ثانیه) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی گراد) رسیده اند. کالیبراتورها، کنترل ها و نمونه ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.

- ۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام تست را بردارید و بقیه چاهک ها را همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید.
- ۲) حجم ۵۰ میکرو لیتر از کالیبراتورها، کنترل و نمونه های استخراج شده را در چاهک های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک ها ریخته شود.
- ۲) حجم ۵۰ میکرو لیتر از محلول کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
- ۳) حجم ۵۰ میکرو لیتر از محلول کونژوگه بیوتینی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
- ۴) چاهک ها را با برجسب مخصوص پلیت بشویند و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- ۵) محتویات چاهک ها را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرو لیتر محلول شستشوی آماده شده، (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) بشویند. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت گیر بزنید. به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت^۱ اقدام نمایید.
- ۶) حجم ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک ها بریزید و پلیت را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری نمایید.
- ۷) حجم ۵۰ میکرو لیتر محلول متوقف کننده به کلیه چاهک ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.
- ۸) مقدار جذب نوری را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج رفرانس ۶۳۰-۶۲۰ نانومتر استفاده کنید). در این آزمایش محاسبه غلظت به روش Point to Point و 4PL (یا Logic-log) 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 به عنوان نمونه ارائه شده است.

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

علائم استفاده شده در پرچسب 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
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

۷) بررسی حساسیت (Sensitivity)

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

$$\text{LOD} = \text{LOB} + 1.645 \text{ SDs}$$

$$\text{LOB} = \text{Meanb} + 1.645 \text{ SDb}$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

۸) بررسی پایداری (Stability)

جهت تعیین میزان پایداری کیت Folate سه نوع تست پایداری متفاوت به شرح زیر انجام شد.

Accelerated stability test: در این تست، کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس نتایج آن بررسی و با نتایج روز صفر، مقایسه گردید.

In use stability test: در این تست، کیت پس از باز کردن در محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (یخچال) قرار داده شد و سپس نتایج آن بررسی و با نتایج روز صفر، مقایسه گردید.

Shelf stability test: در این تست، ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (یخچال) قرار داده شد و هر سه ماه یک بار بررسی گردید. سپس نتایج هر بار بررسی با نتایج روز صفر، مقایسه شد. نتایج مطالعات مختلف بررسی پایداری، نشان می‌دهد که کیت موردنظر در زمان‌های مشخص شده پایدار است و افت OD کالیبراتورها کمتر از ۲۰ درصد می‌باشد.

Sample/ Control	1	2	3	Ctrl. 1	Ctrl. 2	Ctrl. 3
No. of Repeats	20	20	20	20	20	20
Mean (ng/mL)	5.24	8.28	12.80	3.21	7.12	18.05
SD (ng/mL)	0.31	0.47	0.65	0.19	0.40	0.93
CV (%)	5.9	5.7	5.1	5.9	5.5	5.1

۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به اژه 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	6.45	9.45	7.95	7.81	98.2
2	14.26	6.45	10.36	10.48	101.2
3	9.45	14.26	11.86	11.51	97.1

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	8.36	-2.9	2.4	-1.0	-1.9
2	12.42	0.8	-2.6	-1.9	-2.3
3	16.18	1.2	-1.8	-3.1	-3.2

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:

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

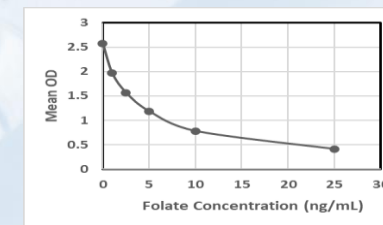
۶) بررسی تداخلات (Interference)

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

$$100 \times \frac{\text{غلظت قبل از افزودن آنالیت مداخله گر} - \text{میانگین غلظت بعد از افزودن آنالیت}}{\text{غلظت آنالیت مداخله گر}}$$

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

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (ng/mL)
Cal. A	A1	2.529	2.576	0
	B1	2.623		
Cal. B	C1	1.935	1.973	1
	D1	2.011		
Cal. C	E1	1.539	1.569	2.5
	F1	1.599		
Cal. D	G1	1.158	1.186	5
	H1	1.214		
Cal. E	A2	0.758	0.783	10
	B2	0.808		
Cal. F	C2	0.395	0.412	25
	D2	0.429		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای Folate

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

جمعیت بالغین نرمال	>3.0 (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)	3.36	6.81	14.53	3.10	7.04	18.16
SD (ng/mL)	0.19	0.36	0.7	0.17	0.32	0.79
CV (%)	5.6	5.3	4.8	5.5	4.5	4.3

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.

References:

- Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; Nov 8, (2013).
- 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).
- 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.