

MONOKIT

کیت اندازه‌گیری **25-Hydroxy Vitamin D** در سرم انسان
Sensitive 25-OH Vitamin D ELISA Kit
96 Tests: Cat. No: 6734-96
192 Tests: Cat. No: 6934-192
Rev: B3 (1403/01/20)

مقدمه:

ویتامین D یک هورمون استروئیدی است که در جذب فعال روده‌ای و تنظیم هومئوستاز کلسیم نقش دارد. این ویتامین دارای دو ایزومر تحت عناوین D2 و D3 می‌باشد. در کبد یک گروه هیدروکسیل به کربن ۲۵ ویتامین D، اضافه و ۲۵-هیدروکسی ویتامین D تولید می‌شود. این متابولیت، فرم غالب ویتامین D در گردش خون را تشکیل می‌دهد و به‌عنوان نشانگر دقیق میزان ویتامین D یک فرد در نظر گرفته می‌شود. با انتقال ۲۵-هیدروکسی ویتامین D به کلیه‌ها و انجام آخرین مرحله هیدروکسیلاسیون، فرم فعال (۱،۲۵-دی هیدروکسی ویتامین D) حاصل می‌شود که ایفاگر نقشی حیاتی در کنترل متابولیسم استخوان است. کمبود ویتامین D به‌عنوان عامل دخیل در بسیاری از بیماری‌ها از جمله پوکی استخوان، راشیتیس و استئومالاسی شناخته می‌شود. حیطة کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی غلظت ویتامین D در سرم انسان به روش الایزا می‌باشد.

اصول آزمایش:

این آزمایش بر اساس الایزای رقابتی طراحی شده است. نمونه‌ها، کالیبراتورها و کنترل‌ها به‌همراه محلول رهاکننده در چاهک‌ها ریخته می‌شوند. در طی زمان انکوباسیون اول، ویتامین D از پروتئین‌های اتصال‌ی رها شده و به آنتی‌بادی تثبیت شده در سطح چاهک‌ها متصل می‌شود. پس از تخلیه و شستشوی چاهک‌ها، ویتامین D کونژوگه شده با آنزیم HRP اضافه می‌شود و به جایگاه‌های خالی آنتی‌بادی در سطح چاهک متصل می‌گردد. پس از شستشوی مجدد چاهک‌ها، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و محلول متوقف‌کننده محصول نهایی تولید می‌شود که بیشترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد. شدت جذب نوری هر چاهک با غلظت ویتامین D موجود در آن نسبت معکوس دارد. غلظت ویتامین D در نمونه‌ها توسط منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

کیت ۱۹۲ تستی	کیت ۹۶ تستی	محتویات کیت
دو عدد	یک عدد	پلیت ۹۶ تستی حاوی آنتی‌بادی تثبیت شده ضد Vit D
شش ویال با غلظت‌های ۰.۲، ۱.۰، ۳.۰، ۵.۰، ۷.۰، ۱۲.۰ ng/mL	شش ویال با غلظت‌های ۰.۲، ۱.۰، ۳.۰، ۵.۰، ۷.۰، ۱۲.۰ ng/mL	کالیبراتور (Vit D Cal A-F)
دو ویال ۱۱ میلی‌لیتری	یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری	محلول کونژوگه آنزیمی (Vit D Enzyme Conjugate)
دو ویال ۱۱ میلی‌لیتری	یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری	محلول رهاکننده (Vit D Releasing Agent)
یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری	یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری	محلول شستشو (50X) (Wash Solution-50X)
دو ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	محلول رنگزا A (Substrate Solution A)
دو ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری	محلول رنگزا B (Substrate Solution B)
یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری	یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری	محلول متوقف‌کننده (Stop Solution)
ویال (های) ۰/۵ میلی‌لیتری	ویال (های) ۰/۵ میلی‌لیتری	محلول کنترل (Vit D Control)
دو ورق	یک ورق	برچسب مخصوص پلیت

توجه ۱: تمام محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است. معرف‌های باز شده در صورت نگهداری در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ روز پایدار می‌باشند.
توجه ۲: مقادیر کنترل (ها) در برگه COA درج شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

- دستگاه خوانش گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
- سمپلر کالیبره.
- آب مقطر دیونیزه.

احتیاط در استفاده از کیت:

- 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.
- کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.
- توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.

۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBs Ag، HIV1/2 و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شود.

۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. 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 به‌هنگام 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) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا یک ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.

آماده‌سازی معرف‌ها:

- 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 بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.
- آماده‌سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر

محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

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، نمونه‌ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت کنید.

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک‌ها را به‌همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رهاکننده Vit D به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید.

۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بیوشانید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده‌شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) 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^۱ اقدام نمایید.

۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی Vit D به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

۷) پلیت را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید و چاهک‌ها را مطابق با مرحله ۵ شستشو دهید.

۸) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا آماده شده (بخش آماده سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید.

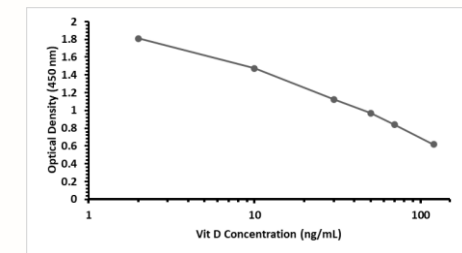
1. <http://www.samantajhiz.com/Support.aspx>

پلیت را به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.
توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۹) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

۱۰) شدت جذب نوری هر چاهک را (حداکثر تا ۱۵ دقیقه پس از متوقف کردن واکنش) در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری نمایید (از طول موج رفرنس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). در این آزمایش از روش 4PL (یا Logit-log) برای محاسبه غلظت استفاده نمایید. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر آورده شده است. توجه: در صورت عدم امکان استفاده از نمودار 4PL، نمودار Point to Point نیز جهت محاسبه غلظت قابل استفاده می‌باشد.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (ng/mL)
Cal. A	A1	1.72	1.81	2
	B1	1.9		
Cal. B	C1	1.503	1.474	10
	D1	1.446		
Cal. C	E1	1.109	1.123	30
	F1	1.137		
Cal. D	G1	0.962	0.971	50
	H1	0.981		
Cal. E	A2	0.772	0.84	70
	B2	0.908		
Cal. F	C2	0.573	0.616	120
	D2	0.66		



مقادیر مورد انتظار برای تست ایزای Vit D

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به قرار زیر مشخص کرده است. هرچند این مقادیر برای آنالیت مورد نظر باید توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

Level	Conc. (ng/mL)
Deficient	< 20
Insufficient	20 - 29
Sufficient	30 - 100
Potential Toxicity	>100

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 $CV < 10\%$ است.

Sample / Control	1	2	3	Cont. 1	Cont. 2	Cont. 3
No. of Repeats	20	20	20	20	20	20
Mean (ng/mL)	11.44	31.28	73.56	8.05	28.43	89.11
SD (ng/mL)	0.57	1.42	3.28	0.37	1.29	3.77
CV (%)	5.0	4.5	4.4	4.6	4.5	4.2

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 $CV < 10\%$ است.

Sample / Control	1	2	3	Cont. 1	Cont. 2	Cont. 3
No. of Repeats	20	20	20	20	20	20
Mean (ng/mL)	10.14	57.3	82.54	8.17	28.66	88.59
SD (ng/mL)	0.53	2.77	3.63	0.42	1.31	3.52
CV (%)	5.2	4.8	4.4	5.1	4.6	4.0

۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و سطح Vit D در ترکیب به‌دست آمده اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش، $Bias < 10\%$ نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	% Rec.
1	7.2	16.5	11.85	11.63	98.1
2	31.7	115.4	73.55	70.90	96.4
3	23.6	74.1	48.85	51.2	104.8

۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست، غلظت Vit D در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $Bias < 10\%$ است.

No.	Sample (ng/mL)	Bias %			
		1/2	1/4	1/8	1/16
1	36.81	2.3	-2.5	2.8	-3.4
2	41.81	-2.0	2.2	2.3	-2.9
3	93.11	1.3	-1.7	1.9	2.7

۵) بررسی ویژگی-آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)

ویژگی این آزمایش با کمک اضافه کردن ترکیبات مندرج در جدول زیر به نمونه سرم، سنجش شد. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت غلظت ماده اضافه شده به غلظت Vit D مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب ارزیابی شد. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده $10 \pm 1.0\%$ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Analyte	Cross Reactivity
25-OH vitamin D2	1.000
25-OH vitamin D3	1.000
vitamin D2	0.0076
vitamin D3	0.004

۶) بررسی تداخلات (Interference)

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

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

موارد ذکر شده در جدول زیر در واکنش اندازه‌گیری Vit D اثرگذار نیستند و مداخله ایجاد نمی‌کنند.

Hemoglobin	Up to 5 g/dL
Triglyceride	Up to 10 g/dL
Bilirubin	Up to 0.2 g/dL
Cholesterol	Up to 10 g/dL

۷) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت به روش 4PL و براساس (LOD) Limit of Detection و (LOB) Limit of Blank با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با $2/1 \text{ ng/mL}$ تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

$$LOB = \text{Mean}_b + 1.645 SD_b$$

(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 مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

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
OBL	Own Brand Labing
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

- Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; Nov 8, (2013).
- Palmore GT, Siu V, inventors; Palmore G Tayhas R, assignee. Intein-based fluorescent bio-circuit for vitamin d detection. United States patent application US 13/387,207. Jul 30, (2010).
- Enko D, Kriegshäuser G, Stolba R, et al. Method evaluation study of a new generation of vitamin D assays. Biochemia medica; 25 (2): 203-12, Jun 15, (2015).

در صورت بروز هر گونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

www.samantajhiz.com

تهران- بزرگراه آشناسان- سردار جنگل شمالی- خیابان

پنج تن- بلوار قدس- کوچه دوم شرقی- پلاک ۸

تلفن: ۰۲۱۸۵۵۱۸۰۰۰