کیت سنجش 25-OH Vitamin D (TR) به روش الایزا

این کیت برای سنجش ویتامین D در سرم انسانی به روش الایزا می باشد .

مقدمه :

ویتامین D به دو شکل ایزومری بنامهای ارگوکلسیفرول (Vitamin D2) و کوله کلسیفرول (Vitamin D3) یافت می شود. ویتامین D یکی از ویتامین‌های لازم برای بدن و از ویتامین‌های محلول در چربی است که به رشد و استحکام استخوانها از طریق کنترل تعادل کلسیم و فسفر کمک می‌کند. این ویتامین با ایجاد افزایش جذب فسفر و کلسیم از روده‌ها و کاهش دفع از کلیه به متابولیسم استخوان‌ها کمک می‌کند. همچنین از طریق ترجمه ژنهای هسته سلول به رشد سلول کمک می‌کند . بعلاوه گزارش شده است که مقادیر خارج از محدوده طبیعی ویتامین D باعث افزایش ریسک ابتلا به برخی از سرطانها می شود.
منبع اصلی دریافت این ویتامین بجز منابع گیاهی (مثل غلات) و حیوانی (مثل ماهی، ساردین، شیر و تخم مرغ)، نور آفتاب است. در کبد ویتامین D هیدروکسیله می شود (25-OH VitD) و این شکل ، فرم اصلی نشان دهنده وضعیت افراد از نظر این ویتامین می باشد. جدی ترین عوارض کمبود ویتامین D، کاهش کلسیم خون، کاهش فسفر خون، بیماری ریکتز (نرمی استخوانها در دوران کودکی) و استئومالاسی (نرمی استخوان ها در دوره بزرگسالی) می باشند.
عارضه شایع دیگر، کمبود تحت بالینی ویتامین D است که به مواردی اطلاق میشود که در آن مقدار ویتامین D کمتر از حد نرمال است ولی علائمی وجود ندارد. این حالت با کاهش تراکم استخوانی، کاهش خفیف کلسیم خون، افزایش مقدار هورمون پاراتیروئید و افزایش خطر شکستگی استخوان در ضربه های جزیی همراه است.
استفاده بیش ازحد از این ویتامین مخصوصاً اگر همراه با مصرف زیاد کلسیم باشد منجر به مسمومیت می‌گردد. استفاده از مکمل های ویتامین D بطور مستمر باعث مشکلاتی مانند رسوب کلسیم در بافتهای نرم مثل کلیه‌ها ، ریه‌ها ، قلب و گوش می‌شود.

اساس آزمایش :

کیت **25-OH Vitamin D (TR)** حاضر، به روش رقابتی و به کمک آنتی بادی مونوکلونال طراحی گردیده است. در این روش چاهکها توسط آنتی بادی مونوکلونال که بر علیه مولکول 25-OH Vitamin D می باشد پوشش داده می شوند (Coating) . استانداردها و نمونه بیماران با آنتی بادی پوشش داده شده در ته چاهکها به همراه بافر استخراج جهت استخراج ویتامین D از پروتئین متصل شونده آن (Vitamin D Binding Protein) ، مجاور می شوند. پس از انکوباسیون و شستشو ، **25-OH Vitamin D که متصل به بیوتین است به همراه استرپتاویدین متصل به آنزیم HRP که در بیرون چاهک با هم مخلوط شده اند به چاهکها اضافه می شود که این 25-OH Vitamin D بیوتینه (Biotinylated 25-OH Vitamin D) متصل شده با آنزیم با 25-OH Vitamin D نمونه ها در اتصال به آنتی بادیهای کوت شده در چاهکها رقابت می کند. هر چه مقدار 25-OH Vitamin D در نمونه بیشتر باشد مقدار 25-OH Vitamin D بیوتینه کمتری به آنتی بادی های کوت شده متصل می گردد و بالعکس** . پس از شستشو ، محلول رنگزا که محتوی هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و کروموژن است به داخل چاهکها ریخته شده و انکوبه می گردد که بعد از انکوباسیون رنگ آبی پدید آمده به صورت معکوس با غلظت 25-OH Vitamin D موجود در نمونه ها متناسب است . برای جلوگیری از فعالیت بیش از اندازه و نامناسب آنزیم ، محلول متوقف کننده افزوده می گردد که فعالیت آنزیم را مختل کرده و رنگ آبی را به زرد تبدیل می نماید که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد .

محتویات کیت :

۱) پلیت حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد ویتامین D (Anti-Vitamin D Coated Plate)
۲) محلول اسی بافر (Assay Buffer) : ویال حاوی محلول بافری آماده مصرف.
۳) محلول بافر استخراج (Extraction Buffer) : ویال حاوی محلول استخراج ویتامین D از پروتئین متصل شونده به آن (Vitamin D Binding Protein)
تذکر مهم: به دلیل وجود مواد فرار در این محلول، درب ویال را بلافاصله پس از برداشت محلول مورد نیاز محکم ببندید .
۴) محلول کنژوگه غلیظ (Biotinylated 25-OH Vitamin D) : ویال حاوی محلول ویتامین D متصل به بیوتین (بصورت x 20) .
۵) محلول رقیق کننده کنژوگه (Conjugate Diluent) : ویال حاوی محلول جهت رقیق کردن کونژوگه .
۶) سری استانداردها (Standards Set) : شامل ۶ ویال استاندارد با غلظتهای ۰، ۵، ۱۰، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ ng/ml از 25-OH Vitamin D کالیبره شده مطابق پروتکل برنامه استاندارد سازی ویتامین D (VDSP) با استاندارد مرجع 972 (SRM) NIST .
۷) سرم کنترل (Controls Serum) : دو ویال حاوی سرم کنترل با غلظتهای مشخص شده بر روی برچسب ویال .
۸) محلول شستشو (Wash Solution) : ویال حاوی محلول شستشوی غلیظ (۲۰X) . جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید .
۹) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate) : ویال حاوی محلول آماده مصرف .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش ششم – مرداد ۱۳۹۷
CE

۱۰) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : ویال حاوی محلول آماده مصرف .
۱۱) برچسب مخصوص پلیت .

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند :

۱) دستگاه الایزاریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) .
۲) سمپلر متغیر دقیق ۱۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر .
۳)دستگاه انکوباتور ۳۷ درجه .
۴) آب مقطر .
۵) نوار جاذب

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

۱) محتویات این کیت فقط برای مصرف در همین کیت می باشد .
۲) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید .
۳) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg و آنتی بادی های ضد HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند ، جهت احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند .

هشدار های توصیه ای:

این کیت برای سنجش ویتامین D به روش دستی (غیر دستگاهی) می باشد . در صورت نیاز برای استفاده با روش دستگاهی لطفاً با کارشناسان فنی شرکت تماس حاصل فرمائید.

شرایط نگهداری :

۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگهداری نمایید .
۲) چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید .
۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد .
۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۸ – ۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد .

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

نمونه مورد استفاده در این کیت نمونه سرمی می باشد . سرم ها را می توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود، سرمها می تواند برای مدت دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و یا برای مدت طولانی تر (حداکثر تا ۷ روز) در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شود . در ضمن باید از Freeze–thaw نمودن نمونه پرهیز شود .

توضیحات عمومی :

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق برسانید .
۲) بهتر است به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند .
۳) از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید .
۴) جهت تهیه محلول شستشو با غلظت کاری x ۱، محلول شستشوی غلیظ x ۲۰ را ۱ به ۲۰ رقیق کنید. برای مثال ml wash ۵۰ به علاوه ml ۹۵۰ آب مقطر .
۵) پس از افزودن محلول متوقف کننده ، جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .
۶) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند .
۷) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب، زمان انکوباسیون مناسب می باشد ، بنابراین پیشنهاد می گردد **قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را** (**به جزء محلول کونژوگه که می بایست بعد از انکوباسیون اول تهیه شود) آماده نموده** و درب محلولهای مورد نیاز را باز کنید ، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیقتر می شود .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش ششم – مرداد ۱۳۹۷

۸)محلول بافر واکنش از مخلوط کردن با حجم یکسان از دو محلول Assay Buffer و Extraction Buffer به دست می آید.

مراحل انجام آزمایش :

۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب نموده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .
۲) ۲۰ میکرولیتر از هر استاندارد، سرم کنترل و نمونه را به داخل هر چاهک بریزید، پیشنهاد می گردد که از استانداردها و نمونه ها بصورت داپلیکیت استفاده شود بدین معنی که هر استاندارد و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید .
۳) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول واکنش (Reaction buffer) را به داخل هر چاهک بریزید. جهت تهیه محلول بافر واکنش (Reaction buffer) می بایست به ازای هر چاهک به میزان ۷۵ میکرولیتر از بافر استخراج را با ۷۵ میکرولیتر محلول اسی بافر در لوله آزمایش بخوبی با هم مخلوط کنید .
۴) پلیت را برای مدت ۲ دقیقه به آرامی shake کنید تا محتویات چاهکها خوب مخلوط شوند و سپس درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید .
تذکر مهم: عمل تکان دادن پلیت را تا مخلوط شدن کامل و یکنواخت شدن رنگ محتویات چاهک ها ادامه دهید. جهت شیکینگ پلیت می توان از دستگاه شیکر پلیت با دور 500 RPM به مدت ۲ دقیقه استفاده نمود .
۵) پس از پایان انکوباسیون محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (برای شستشو میتوان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد، در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید **و از هر گونه Soaking time در مراحل شستشو *پرهیز شود*** . در انتهای عملیات شستشو چاهکها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند .
۶) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه رقیق شده را به داخل هر چاهک بریزید . جهت تهیه این محلول می بایست به ازای هر استریپ به میزان ۹۵۰ میکرولیتر از محلول رقیق کننده کونژوگه را با ۵۰ میکرولیتر محلول کونژوگه غلیظ در لوله آزمایش بخوبی با هم مخلوط کنید .توصیه می شود جهت جلوگیری از افت O.D؛ محلول کونژوگه آماده مصرف را پس از اتمام انکوباسیون اول تهیه نمایید.
۷) درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید .
۸) پس از پایان انکوباسیون محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (برای شستشو میتوان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد، در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید **و از هر گونه Soaking time در مراحل شستشو *پرهیز شود*** . در انتهای عملیات شستشو چاهکها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند .
۹) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) به هر چاهک اضافه نمایید .
۱۰) چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید .
۱۱) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزاریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نمایید . توصیه میشود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد .

محاسبه نتایج :

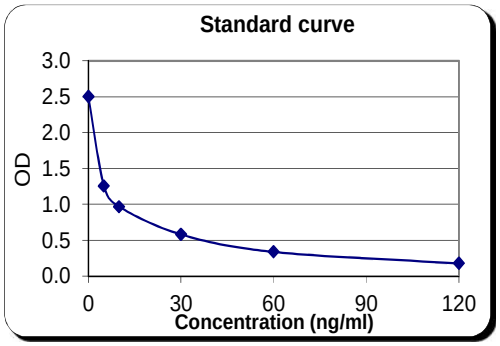
از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm میتوان استفاده نمود .

۱) جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید .

۲) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آنها نموداری (Point to point) رسم کنید به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آنها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد بدست آورید ، سپس نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی بدست آید .
۳) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن را پیدا کنید، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید بطوریکه این خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و بعد از محل تلاقی خط و منحنی خطی عمود بر محور افقی وارد کنید نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد.

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش ششم – مرداد ۱۳۹۷

۴) نمونه ای از نتایج و شکل منحنی استاندارد در جدول شماره ۱ نشان داده شده است .



جدول شماره 1

	استانداردها ng/ml	جذب نوری 450/630
St1	0	2.50
St2	5	1.26
St3	10	0.97
St4	30	0.58
St5	60	0.34
St6	120	0.18

توجه ۱: جذبهای نوری و منحنی مربوطه فقط به عنوان نمونه می باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید .

توجه ۲: مقادیر بیش از 120 ng/ml می بایست بصورت >120 ng/ml گزارش شود .

مقادیر مورد انتظار :

مقادیر نرمال 25-OH Vitamin D در سرم افراد طبیعی که توسط تستهای مکرر به روش الایزا بدست آمده بقرار زیر می باشد ولی پیشنهاد میگردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد :

Level	Range (ng/ml)
Deficient	**< 20**
Insufficient	**20 - 29**
Sufficient	**30 - 100**
Potential Toxicity	**> 100**

تبدیل واحد ویتامین D :

جهت تبدیل واحد ویتامین D می توانید از فرمول زیر استفاده نمایید.

ng/ml × 2.5 = nmol/L

به عنوان مثال 25 ng/ml پس از اعمال فرمول مذکور 62.5 nmol/L می شود.

محدودیت های روش اندازه گیری:

سطوح سرمی 25-OH Vitamin D به تنهایی نباید به عنوان شاهد مطلق وجود یا عدم بیماری بکار رود .

نتایج تست می بایست فقط همراه با سایر تست ها و روشهای تشخیصی در روند **درمان** بیماران مورد تفسیر قرار گیرد .

شیک یا تکان دادن ناکافی پلیت به منظور مخلوط کردن محتویات آن (بافر واکنش) موجب وارياسيون و نتایج ناصحیح می شود .

گاهی اوقات آنتی بادیهای هتروفیل که در نمونه سرم برخی از بیماران دیده می شوند، با وجود مواد بلاک کننده قوی ضد آنها در محلول های کیت، امکان تداخل دارند .

از بکار بردن نمونه های همولیز خودداری نمایید.

شاخصهای اجرایی :

۱) حساسیت :

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و منهای سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت 25-OH Vitamin D قابل تشخیص در این **کیت 3.5 ng/ml می باشد و مقادیر کمتر از آن می بایست بصورت 3.5 ng/ml > گزارش شود .**

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش ششم – مرداد ۱۳۹۷

۲) دقت آزمایش :

آزمایشهای اینترا- اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و اینتر- اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایشات مختلف) با استفاده از ۳ سرم با غلظتهای مختلف 25-OH Vitamin D انجام گردید که در جداول ۱ و ۲ آمده است :

جدول شماره ۱ (اینترا- اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (ng/ml)	SD	CV (%)
۱	۱۰	۱۲	۱/۷	۱۴/۲
۲	۱۰	۵۴	۲/۲۱	۴/۱
۳	۱۰	۱۰۴	۲/۲۸	۲/۲

جدول شماره ۲ (اینتر- اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (ng/ml)	SD	CV (%)
۱	۲۴	۱۰/۲۶	۱/۷۱	۱۶/۷
۲	۲۴	۳۳/۲۶	۳/۶۶	۱۱
۳	۲۴	۱۱۲	۳/۸	۳/۴

۳) اختصاصیت آزمایش :

اختصاصیت این آزمایش به کمک سرمهائی با غلظتهای مشخص از مواد اضافه شده مختلف به آنها ، جهت بررسی واکنشهای متقاطع با 25-OH Vitamin D بررسی شد که نتایج آن در جدول زیر آمده است :

آنالیت	غلظت (ng/ml)	واکنش متقاطع به درصد
25-OH-Vitamin-D3	۱۰	۱۰۰
25-OH-Vitamin-D2	۱۰	۱۰۰
1,25-OH-Vitamin-D3	۱۰۰	۹/۵
1,25-OH-Vitamin-D2	۷۰	۶
Vitamin-D3	۲۵	<۰/۱
Vitamin-D2	۲۰	<۰/۵
24,25-OH-Vitamin-D3	۵۰	۳/۵
3-epi-25-OH-Vitamin-D2	۲۰	۵
3-epi-25-OH-Vitamin-D3	۲۰	۱/۵

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

۴) ریکاوری آزمایش :

مقادیر معلومی از 25-OH Vitamin D به ۴ نمونه سرم با غلظتهای مشخص 25-OH Vitamin D افزوده شده و ریکاوری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول آمده است .

نمونه	مقدار 25-OH Vitamin D موجود در نمونه (ng/ml)	مقدار 25-OH Vitamin D افزوده شده (ng/ml)	مقدار مورد انتظار (ng/ml)	مقدار بدست آمده (ng/ml)	ریکاوری (%)
۱	۱۵	۱۰	۱۲/۵	۱۱/۹	۹۵/۲
۱	۱۵	۲۵	۲۰	۱۹	۹۵
۱	۱۵	۷۰	۴۲/۵	۴۰/۵	۹۵/۲
۲	۳۸	۱۰	۲۴	۲۵	۱۰۴/۱
۲	۳۸	۲۵	۳۱/۵	۳۲	۱۰۱/۵
۲	۳۸	۷۰	۵۴	۵۶/۵	۱۰۴/۶
۳	۵۹	۱۰	۳۴/۵	۳۳/۵	۹۷/۱
۳	۵۹	۲۵	۴۲	۴۰	۹۵/۲
۳	۵۹	۷۰	۶۴/۵	۶۲	۹۶/۱
۴	۱۰۴	۱۰	۵۷	۵۹/۵	۱۰۴/۴
۴	۱۰۴	۲۵	۶۴/۵	۶۶	۱۰۲/۳
۴	۱۰۴	۷۰	۸۷	۹۱	۱۰۴/۶

۵) خطی بودن آزمایش :

با استفاده از استاندارد صفر ، رقتهای متوالی از ۵ نمونه سرم با غلظت مشخص از 25-OH-Vitamin-D تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت محاسبه شد که در جدول زیر نتایج آن آورده شده است .

نمونه	مقدار 25-OH VitaminD موجود در سرم رقیق نشده (ng/ml)	ریکاوری (٪)			
		رقت ۱/۲	رقت ۱/۴	رقت ۱/۸	رقت ۱/۱۶
۱	۱۸/۳	۱۱۰	۱۰۸	*	*
۲	۳۷/۳	۹۲	۹۳	۹۷	*
۳	۵۸/۹	۹۸	۱۱۱	۹۲	۸۹
۴	۹۵	۱۰۳	۱۰۶	۱۰۸	۱۱۵
۵	۱۱۲	۱۰۴	۱۰۳	۹۹	۱۱۶

***در محدوده پایین تر از حداقل مقدار قابل اندازه گیری ، امکان بررسی وجود ندارد .**

References :

1. *Holick MF (March 2006). "High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health". Mayo Clin. Proc. 81 (3): 353–73. doi:10.4065/81.3.353.PMID 16529140.*
2. *Calvo MS, Whiting SJ, Barton CN; Whiting; Barton (February 2005). "Vitamin D intake: a global perspective of current status". J. Nutr. 135 (2): 310–6. PMID 15671233.*
3. *Norman AW (August 2008). "From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health". Am. J. Clin. Nutr. 88 (2): 491S–499S. PMID 18689389.*
4. *Wolf G (June 2004). "The discovery of vitamin D: the contribution of Adolf Windaus". J Nutr 134 (6): 1299–302. PMID 15173387.*

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

ویرایش ششم – مرداد ۱۳۹۷

5. *Pittas AG, Chung M, Trikalinos T, Mitri J, Brendel M, Patel K, Lichtenstein AH, Lau J, Balk EM; Chung; Trikalinos; Mitri; Brendel; Patel; Lichtenstein; Lau; Balk (Mar 2010)."Vitamin D and Cardiometabolic Outcomes: A Systematic Review". Annals of internal medicine 152 (5): 307–14. doi:10.7326/0003-4819-152-5-201003020-00009.PMC 3211092. PMID 20194237.*
6. *Fan LY, Zhong RQ, Tu XQ, Zhu Y, Gong CL, Zhou L, Zhao ZX, Feltens* R, Pfeiffer* T. (*EUROIMMUN AG). Genetic association of vitamin D receptor polymorphisms with primary biliary cirrhosis and autoimmune liver diseases on Chinese. [Article in Chinese] Zhonghua Yi Xue Za Zhi 83 (2003) 1852-1855.*
7. *Ginde AA, Liu MC, Camargo CA Jr. Demographic differences and trends of vitamin D insufficiency in the US population, 1988-2004. Arch Intern Med 169 (2009) 626-632.*
8. *EUROIMMUN AG. Stöcker W, Schlumberger W, Krüger C. Alle Beiträge zum Thema Autoimmundiagnostik. In: Gressner A, Arndt T (Hrsg.) Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 2. Auflage. Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2012).*
9. *Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. Am J Clin Nutr 87 (2008) 1080-1086.*
10. *Joseph AJ, George B, Pulimood AB, Seshadri MS, Chacko A. 25 (OH) vitamin D level in Crohn's disease: association with sun exposure & disease activity. Indian J Med Res 130 (2009) 133-137.*
11. *Judd SE, Tangpricha V. Vitamin D deficiency and risk for cardiovascular disease. Am J Med Sci 338 (2009) 40-44.*
12. *Knutsen KV, Brekke M, Gjelstad S, Lagerløv P. Vitamin D status in patients with musculoskeletal pain, fatigue and headache: a cross-sectional descriptive study in a multi-ethnic general practice in Norway. Scand J Prim Health Care 28 (2010) 166-171.*

روش انجام آزمایش 25-OH Vitamin D (TR) بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی بادی جهت تست 25-OH-Vitamin D			
محلولها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
استانداردها	۲۰ میکرولیتر	–	–
سرم کنترل	–	۲۰ میکرولیتر	–
نمونه	–	–	۲۰ میکرولیتر
*بافر واکنش	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
پلیت را به ملایمت برای مدت ۲ دقیقه تکان دهید تا محتویات چاهکها بخوبی مخلوط شوند. **تذکر مهم: عمل تکان دادن پلیت را تا مخلوط شدن کامل و یکنواخت شدن رنگ محتویات چاهک ها ادامه دهید.** **سپس دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید. ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کنید . برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .**			
کنژوگه	**۱۰۰ میکرولیتر**	**۱۰۰ میکرولیتر**	**۱۰۰ میکرولیتر**
سپس دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید. ۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کنید. **برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .**			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید .			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را با طول موج ۴۵۰ نانومتر(و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید .			

* (بافر واکنش می بایست بر اساس بند شماره ۳ مراحل انجام آزمایش، موجود در بروشور ساخته شود.)

** (محلول کنژوگه می بایست مطابق با روش کار ذکر شده در بروشور ساخته شود) .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش ششم – مرداد ۱۳۹۷

جدول محتویات کیت

محتویات کیت	فرمت ۴۸ تستی	فرمت ۹۶ تستی	فرمت ۱۹۲ تستی
پلیت Plate	1 × 48 Wells	1 × 96 Wells	2 × 96 Wells
محلول اسی بافر Assay Buffer	1×3.5 ml	1×7.5 ml	1×15 ml
محلول بافر استخراج Extraction Buffer	1×3.5 ml	1×7.5 ml	1×15 ml
محلول کنژوگه غلیظ Conjugate 20x	1×0.5 ml	1×0.75ml	1×1.5 ml
محلول رقیق کننده کنژوگه Conjugate Diluent	1×7.5 ml	1×15 ml	2×15 ml
سری استانداردها Standards Set	St. 6×0.5 ml	St. 6×1 ml	St. 6×2 ml
سرم کنترل Control Sera	2×0.5 ml	2×1 ml	2×2 ml
محلول شستشو Wash Solution	1×25 ml	1×50 ml	2×50 ml
محلول متوقف کننده Stop Solution	1×6 ml	1×12 ml	2×12 ml
محلول رنگزای یک مرحله ای Chromogen - Substrate	1×6 ml	1×12 ml	2×12 ml
برچسب مخصوص پلیت Cardboard Sealer	1	1	2

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش ششم – مرداد ۱۳۹۷