کاربرد

اندازه‌گیری غلظت 25-OH Vitamin D در سرم یا پلاسمای انسانی به روش ایمونوآنزیماتیک (Cat.No. DG.VITD.01)

مقدمه

ساختار و نقش فیزیولوژیک: ویتامین D از ویتامین های محلول در چربی به گروهی از پیش هورمون ها شامل ارگوکلسیفرول (Vitamin D2)، کوله کلسیفرول (Vitamin D3) و همچنین متابولیت ها و آنالوگهای این مواد اطلاق می شود.[۱و۲] ویتامین D3 با منشاء حیوانی، به طور طبیعی در پوست از ۷-دهیدروکلسترول در اثر مجاورت با پرتو ماوراء بنفش B نور خورشید تولید می شود. علاوه بر آن این ویتامین از طریق برخی مواد غذایی مانند ماهی های چرب و مکمل های غذایی نیز قابل جذب است. ویتامین D2 منشاء گیاهی داشته و بوسیله ی تابش آفتاب به آرگوسترول مخمرها ساخته می شود[۳-۷]. تفاوت ساختاری بین دو فرم D2 و D3 در زنجیره های جانبی آنها است. زنجیره جانبی در ویتامین D2 دارای دو باند دوگانه بین کربن ۲۲ و۲۳ بوده و یک گروه متیل بر روی کربن ۲۴ خود دارد.

ویتامین D جذب شده غیر فعال بوده و برای ایفای نقش بر روی بافت های هدف باید دو مرحله Hydroxylation را پشت سر بگذراند. این مولکول پس از ترکیب با Vitamin D binding protein (VDBP) وارد کبد شده و در آنجا یک مولکول OH دریافت می کند. هیدروکسیلاسیون بعدی در میتوکندری های بافت کلیه انجام می شود. این واکنش به وسیله 25-Hydroxy Vitamin D3-1-α-Hydroxylase (25,1) Di hydroxy-Vitamin-D فعال شده و در نهایت تولید می گردد. این مولکول که کلسیتریول (Calcitriol) نام دارد فرم فعال و دارای عملکرد ویتامین D است[۸]. میزان کلسیتریول هزار برابر کمتر از فرم غیرفعال این ویتامین بوده و نیمه عمر کوتاهی دارد. فرم فعال ویتامین D با افزایش جذب کلسیم در روده و تنظیم غلظت کلسیم، فسفر و منیزیم بدن، اصلی ترین تنظیم کننده هوموستاز کلسیم بوده و در تکامل اسکلت و معدنی شدن استخوان ها اهمیت دارد[۹]. دریافت کافی ویتامین D در کودکان از ابتلا به راشیتیسم و ریکتز(rickets) و در بزرگسالان از استئومالاسی پیشگیری می کند. در دوران کهنسالی کمبود این ویتامین باعث بروز بیماری پوکی استخوان بویژه در زنان می شود[۱۰]. علاوه بر آن، این ویتامین در فرآیند رشد سلولی، [۱۱]، عملکرد عصبی-عضلانی، کاهش التهاب؛ ارتقاء عملکرد سیستم ایمنی ، تعادل هورمون های پاراتیروئیدی و تنظیم سطح گلوکز خون نقش دارد.

همچنین در طول چند سال اخیر ، مطالعات نشان دهنده ی این مطلب است که دریافت کافی ویتامین D می تواند در گستره ی وسیعی از بیماری ها مانند انواع سرطان ها و بیماری ها از جمله مولتیل اسکلروزیس، عارضه های قلبی، بیماریهای عفونی از جمله کووید- ۱۹ پسوریازیس و آلزایمر دارای اثرات پیشگیرانه باشد[۱۲-۱۵]. از طرف دیگر با توجه به همبستگی غلظت ویتامین D و کلسیم، مصرف بالای مکمل های حاوی این ویتامین می تواند سطح کلسیم خون را افزایش داده و باعث هایپر کلسمی منتهی به کلسیفیکاسیون بافت های نرم از جمله کلیه ها، ریه ها، قلب و رگ های خونی گردد.

کاربرد بالینی: هرچند مفروض است افرادی که بصورت طبیعی در محیط سرشار از آفتاب زندگی میکنند مقادیر کافی ویتامین D دریافت کنند ولی نتایج بدست آمده از تحقیقات گسترده در خصوص سطح سرمی این پیش هورمون نشان میدهد که حدود یک میلیارد نفر در دنیا به فقر ویتامین D دچارند[۱۶]. اندازه گیری سطح سرمی ویتامین D بخصوص گروههای در معرض فقر آن، از جمله افراد مسن، افرادی که محدودیت قرارگیری در معرض نور خورشید دارند، رنگین پوستان، مبتلایان به بیماریهای التهابی و گوارشی و افراد داری وزن بالا حائز اهمیت است. برخلاف فقر ویتامین D بالابودن سطح سرمی این ویتامین نادر بوده و عموما در افرادی روی میدهد که در درازمدت مقادیر بالای مکمل های ویتامین D دریافت کرده اند. در فصول سرد بدلیل کمتر بودن نور خورشید کمبود ویتامینD به بیشترین حد خود می رسد.

در ایران شیوع فقر ویتامین D بسیار گسترده بوده و در حدود ۷۰-۸۰ درصد تخمین زده میشود[۱۷و۱۸]. مسمومیت ناشی از مصرف بیش از حد ویتامین D با قطع مصرف آن و کم کردن دریافت کلسیم درمان میگردد. همچنین افزایش سطح سرمی ویتامین D می تواند با ترشح بیش از حد هورمون پاراتیروئید و یا بیماری هایی مانند سارکوئیدرز یا برخی از لنفوم ها دیده شود. بدین ترتیب علاوه بر موارد کمبود ویتامین D اندازه گیری **25-OH Vitamin D** می تواند در تشخیص موارد انباشت این پیش هورمون نیز حائز اهمیت می باشد.

اساس روش سنجش

مدت زمان انجام تست: ۱ ساعت + ۱ ساعت + ۱۵ دقیقه

طراحی کیت **25-OH Vitamin D** بر اساس روش ایمونوآنزیماتیک رقابتی است. ابتدا ویتامین D نمونه هادر پلیت Extraction استخراج شده و سپس به پلیت Reaction منتقل می گردد. در این روش بعد از استخراج، ویتامین D موجود در نمونه ها برای اتصال به آنتی بادی مونوکلنال ضد**25-OH Vitamin D**، پوشش داده شده بر روی چاهکها، با **25-OH Vitamin D** متصل به آنزیم پراکسیداز (**25-OH Vitamin D - HRP**) رقابت می کند. در این واکنش رابطه معکوسی بین میزان **25-OH Vitamin D - HRP** متصل به آنتی بادی مونوکلنال ضد **25-OH Vitamin D** با غلظت **25-OH Vitamin D** موجود در نمونه وجود دارد. پس از اتمام انکوباسیون و خارج شدن آنالیتهای غیرمتصل، با افزودن سوبسترا، تترا متیل بنزیدین(TMB)، آنزیم رنگ آبی ایجاد می کند. با اضافه نمودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می شود. شدت رنگ ایجاد شده که با غلظت **25-OH Vitamin D** نمونه ارتباط معکوس دارد، در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) اندازه گیری می گردد.

توجه و احتیاط

- این کیت تشخیصی به صورت *in vitro* قابل استفاده می‌باشد.
- اجزای اختصاصی این کیت برای مصرف با اجزای هم سری ساخت کیت ارائه شده‌اند.
- اجزای عمومی کیت شامل محلول‌های شستشو، رنگ زا و متوقف‌کننده می‌باشند که برای سایر محصولات دیازیست نیز قابل استفاده هستند.
- جهت کاهش پدیده تأخیری، ضرورت دارد زمان انجام مرحله دوم تست در کمتر از ۱۰ دقیقه انجام شود.
- توصیه می‌شود در هر تست استانداردها جهت رسم منحنی استفاده شوند، همچنین درصورتی که همزمان بیش از یک پلیت تست گذاشته شود، رسم منحنی برای هر پلیت ضروری است.
- کالیبره بودن ابزارها و دستگاه‌ها در صحت نتایج اثرگذار است.
- جهت ساخت اجزای این کیت از مواد شیمیایی و زیستی استفاده شده است. لذا توصیه می‌شود هنگام کار از تماس مستقیم با مواد پرهیز نمایید.

محتویات کیت

اجزای تشکیل دهنده‌کیت ۹۶ تستی 25-OH Vitamin D به شرح زیر می باشد:

ردیف	نام اجزاء	مقدار/تعداد	بسته‌بندی
۱	Extraction Plate	1/96 wells	۹۶تستی
۲	Reaction Plate (Anti-25-OH Vitamin D Antibody Coated Microtiter Plate)	1/96 wells	۹۶تستی
۳	استانداردهای A-E (Standards A-E) برحسب (ng/ml) کالیبره شده بر مبنای استاندارد NIST 2972	5/0.5 ml	۹۶تستی
۴	کنترل پایین و بالا (Controls Low & High)	2/0.5 ml	۹۶تستی
۵	محلول شستشوی غلیظ (Concentrated Wash Buffer)	1/25 ml	۹۶تستی
۶	محلول بافر استخراج (Extraction Buffer)	1/12 ml	۹۶تستی
۷	محلول غلیظ آنزیم (HRP) کونژوگه شده به 25 -OH Vitamin D (25 -OH Vitamin D -HRP Conjugate)	1/2.4 ml	۹۶تستی
۸	محلول رنگ زا (TMB Substrate)	1/12 ml	۹۶تستی
۹	محلول متوقف‌کننده (Stop Solution)	1/12 ml	۹۶تستی

DiaZist
کیت سنجش 25-OH Vitamin D

منابع

1. Visser T.J. Oxford Textbook of Endocrinology and Diabetes. Chapter:Biosynthesis, transport, metabolism, and actions of thyroid hormones, Second edition, 2011.
2. DeRuiter J. Thyroid hormone tutorial: the thyroid and thyroid hormones. Endocrine Pharmacotherapy Module: Thyroid Section, Summer, 2001.
3. Kim HY., Mohan S. Role and Mechanisms of Actions of Thyroid Hormone on the Skeletal Development. Bone Research.2: 146-61, 2013.
4. Woeber KA, Ingbar SH. The Contribution of Thyroxine-Binding Prealbumin to the Binding of Thyroxine in Human Serum, as Assessed by Immunoadsorption. J Clin Invest. 47:1710-1721,1968.
5. Mondal S, *et al*. Chemistry and Biology in the Biosynthesis and Action of Thyroid Hormones. Angew Cheme In Engl. 55(27):7606-30, 2016.
6. Epocrates. Thyroid function testing, 2018.
7. Szpunar WE, *et al*. Clinical Evaluation of a Thyroxine-Binding Globulin Assay in Calculating a Free-Thyroxine Index. J Nucl Med. 22:793-795, 1981.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Stability of *In Vitro* Diagnostic Reagents; Approved Guideline – First Edition. NCCLS Document EP25-A. 2009.
9. Wu AHB. Tietz Clinical Guide To Laboratory Tests. Saunders Elsevier, Philadelphia, 4th edition, section II, p. 1046-1048, 2006.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline – Second Edition. NCCLS Document EP5-A2. 2004.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Establishing and Verifying an Extended Measuring Interval Through Specimen Dilution and Spiking – First Edition. EP34. 2018.
12. Holick MF. Vitamin D: the underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health. Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity. 2002 Feb 1;9(1):87-98.
13. Holick MF. Vitamin D deficiency. New England journal of medicine. 2007 Jul 19;357(3):266-81
14. "Office of Dietary Supplements - Vitamin D". ods.od.nih.gov. 9 October 2020. Retrieved 31 October 2020.
15. Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. The American journal of clinical nutrition. 2008 Aug 1;88(2):491S-9S.
16. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. Chemistry & biology. 2014 Mar 20;21(3):319-29.
17. "Vitamin D". Wikipedia. 2020-05-09.
18. MacDonald J. How Does the Body Make Vitamin D from Sunlight. JSTOR Daily. 2019;22:2008-19.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Stability of In Vitro Diagnostic Reagents; Approved Guideline – First Edition NCCLS Document EP25-A. 2009.
20. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline – Second Edition. NCCLS Document EP5-A2. 2004
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline – Second Edition. NCCLS Document EP5-A2. 2004
22. Pruden EL. Clinical guide to laboratory tests. Tietz NW, Finley PR, editors. Philadelphia: WB Saunders company; 1995 May 4.
23. Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. Osteoporosis international. 2005 Jul;16(7):713-6.
24. Vieth R. Why the minimum desirable serum 25-hydroxyvitamin D level should be 75 nmol/L (30 ng/ml). Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism. 2011 Aug 1;25(4):681-91.
25. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Establishing and Verifying an Extended Measuring Interval Through Specimen Dilution and Spiking – First Edition. EP34. 2018

تهران، میدان کتاب، خیابان کوهستان، خیابان صحرا، کوچه گلرخ، پلاک ۳۴
تلفن ویژه: ۷۲۴۵۷-۰۲۱
office@garnimed.com
www.garnimed.com

Published: May. 2023

کیت سنجش 25-OH Vitamin D

DiaZist

شرایط نگهداری و پایداری

- کیت را در دمای ۸–۲ درجه سانتیگراد نگهداری کنید.
- پایداری کیت در دمای ۸–۲ درجه سانتیگراد، قبل از شروع استفاده (In Shelf) و حین استفاده(In use) بر مبنای استاندارد CLSI (EP25-A) [۱۹] بررسی گردید که نتایج به شرح زیر می‌باشد:

قبل از شروع استفاده (In Shelf)	تا پایان تاریخ انقضا
حین استفاده (In use)	تا ۳ ماه

جمع آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه مورد نیاز جهت اندازه‌گیری 25-OH Vitamin D، سرم یا پلاسمای به‌دست آمده با مواد ضد انعقاد هپارین، سیترات سدیم و EDTA می‌باشد. نمونه ها در دمای ۸–۲ درجه سانتیگراد تا ۷ روز و در دمای ۲۰– درجه سانتیگراد تا یک ماه قابل نگهداری هستند.[۲۰] از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه‌ها پرهیز نمایید. جهت اندازه‌گیری 25-OH Vitamin D نمونه‌های منجمد شده، ابتدا نمونه را در دمای اتاق ذوب و بعد با حرکت دست یکنواخت نمایید. جهت پایداری نمونه‌ها از سدیم ازاید(Sodium Azide) استفاده نشود.

مواد و وسایل لازم که همراه کیت عرضه نمی شوند

- دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ و۶۳۰ نانومتر کالیبر شده
- سمپلرهای ۱۰۰ و ۲۵ میکرولیتر کالیبر شده
- سرسمپلرهای یک‌بار مصرف
- آب مقطر برای رقیق سازی محلول شستشوی غلیظ
- انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد

روش انجام تست

قبل از انجام تست:

- تمام مواد و نمونه ها را به دمای اتاق (۲۵–۲۰ درجه سانتیگراد) برسانید.
- برای تهیه محلول شستشوی قابل مصرف، **یک** حجم محلول شستشوی غلیظ(20x) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمایید.

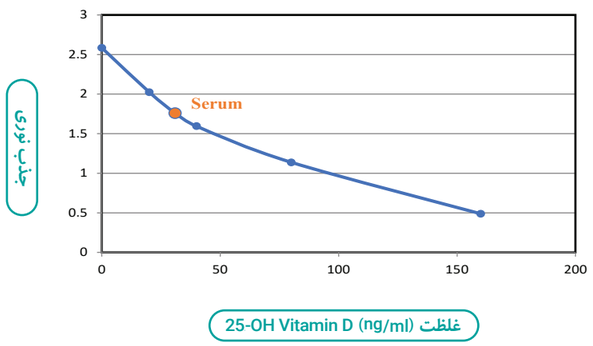
مراحل انجام تست:

۱. ۲۵ میکرولیتر از هر استاندارد، کنترل و نمونه سرم در پلیت Extraction بریزید.
۲. محلول کنژوگه مصرفی را تهیه نمایید. بدین منظور یک حجم محلول کنژوگه غلیظ را با ۱۰ حجم بافر استخراج مخلوط نمایید. خواهشمند است این محلول بعد از اضافه کردن استاندارد ها، کنترل ها و نمونه ها تهیه شده و بلافاصله استفاده گردد.
۳. سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول آنزیم کنژوگه رقیق شده اضافه نموده و پلیت را تکان دهید تا به خوبی مخلوط شوند.
۴. روی چاهک ها را با برچسب مخصوص پوشانده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید.
۵. ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه ها، استاندارد ها و کنترل ها را به پلیت Reaction (Anti-25-OH Vitamin D Coated Microtiter Plate) اضافه نمایید.
۶. روی چاهک ها را با برچسب مخصوص پوشانده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد دهید.
۷. چاهک‌ها را ۵ بار با ۳۵۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.
۸. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگ زا اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۹. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده اضافه نمایید و بعد از مخلوط کردن به مدت ۱۵ ثانیه، میزان جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر، حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، بخوانید.

محاسبه نتایج

غلظت 25-OH Vitamin D نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد (رسم به‌صورت دستی یا دستگاه الایزا ریدر) تعیین می‌گردد. در این منحنی جذب نوری استانداردها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) بر روی محور عمودی (Y) و غلظت آن‌ها را بر حسب ng/ml بر روی محور افقی (X) مشخص کنید و بر اساس آن منحنی را رسم نمایید. با استفاده از منحنی ترسیم شده و جذب نوری بدست آمده از نمونه، غلظت 25-OH Vitamin D آن قابل محاسبه می‌باشد. جدول و نمودار زیر به عنوان مثال ارائه شده است.

نمونه	جذب نوری	غلظت 25-OH Vitamin D (ng/ml)
استاندارد A	۲/۵۸۵	۰
استاندارد B	۲/۰۲۶	۲۰
استاندارد C	۱/۵۹۵	۴۰
استاندارد D	۱/۱۳۹	۸۰
استاندارد E	۰/۴۸۹	۱۶۰
کنترل پایین	۲/۰۳۳	۱۹/۷۲
کنترل بالا	۱/۵۹۷	۳۹/۸۶
سرم	۱/۷۶۱	۳۰/۹۷



کنترل کیفی

تست در صورتی تأیید می‌گردد که:

- جذب نوری استاندارد صفر بیش از ۱/۶ باشد.
- خوانش کنترل‌های پایین و بالای کیت در محدوده مورد قبول باشد.
- توصیه می‌گردد جهت حصول اطمینان از نتایج کیت، علاوه بر کنترل‌های ارائه شده در کیت، به صورت دوره‌ای از کنترل‌های دقت و صحت تجاری نیز استفاده گردد. بدیهی است نتایج بدست آمده بایستی در محدوده مورد قبول قرائت گردد.

کیت سنجش 25-OH Vitamin D

DiaZist

تداخل‌ها و محدودیت‌ها

- جهت بررسی اختصاصیت آنتی بادی به کار رفته در این کیت، اثر تداخلی آنالیت های قید شده در جدول زیر بررسی گردید. درصد تداخل نسبت غلظت 25-OH Vitamin D به ماده افزوده شده است که جایگزین ۵۰٪ واکنشهای 25-OH Vitamin D - HRP با آنتی بادی ضد 25-OH Vitamin D گردیده است. بنا به نتایج مندرج در جدول زیر اثر تداخلی آنالیت های افزوده شده صرف نظر از $1,25(OH)_2$ Vitamin D_3 که بطور معمول در سرم کمتر از ۱۰۰ pg/ml بوده و عملا تداخل معنی داری در نتایج ایجاد نمی کند، قابل توجه نمی باشد.

ماده افزوده شده	درصد تداخل (Cross-reactivity)
25 -OH Vitamin D_3	۱۰۰
25 -OH Vitamin D_2	۱۰۰
Vitamin D_3	<۴
Vitamin D_2	<۴
3-epi-25OH Vitamin D_3	<۴
$1,25(OH)_2$ Vitamin D_3	۲۲
$1,25(OH)_2$ Vitamin D_2	<۴

- اثر تداخلی بیلی روبین (تا ۲۰ mg/dl)، هموگلوبین (تا ۵۰۰ mg/dl)، تری‌گلیسیرید (تا ۳۰۰۰ mg/dl) و فاکتورهای روماتوئید(تا ۱۰۰۰ IU/ml) در سرم کمتر از ۵٪ می باشد.
- نمونه سرم یا پلاسمای افرادی که سابقه درمان یا تشخیص بیماری با مواد حاوی آنتی‌بادی مونوکلنال موش داشته‌اند، می‌تواند حاوی آنتی بادی‌های انسانی ضد موش (HAMA) باشد. با توجه به غلظت آنتی‌بادی و مواد بازدارنده مورد استفاده در این کیت، واکنش‌های تداخلی غیر اختصاصی به حداقل رسیده و تا کنون واکنش مثبت کاذب مشاهده نشده است.
- محدوده قابل اندازه‌گیری غلظت 25-OH Vitamin D با این کیت ۱۲۰– ۵ ng/ml می‌باشد.

مقادیر طبیعی

با توجه به پایین بودن سطح سرمی 25-OH Vitamin D در افراد جامعه، متخصصین توافق نظر بر این دارند که "مقادیر طبیعی" بر اساس میانگین سطح سرمی این ویتامین در افراد سالم جامعه تعریف گردد. بر این اساس همسو با اعلام انجمن طب (Institute of Medicine) محدوده های زیر جهت تفسیر سطح سرمی این ویتامین ارائه می گردد. [۲۱و۲۲]

غلظت 25 - OH Vitamin D	تفسیر
<20 (ng/ml)	Deficient
20 -29 (ng/ml)	Insufficient
30 -100 (ng/ml)	Sufficient
>100 (ng/ml)	Potential Toxicity

نتایج مورد انتظار با کیت سنجش 25-OH Vitamin D دیازیست با اندازه گیری غلظت سرمی 25-OH Vitamin D، ۱۵۱ فرد بالغ جامعه تعیین گردید. غلظت سرمی این ویتامین با فاصله اطمینان ۹۷/۵ تا ۲/۵ درصد در محدوده ۵۷/۹ ng/ml–۸/۸ با میانگین ۲۴/۹ ng/ml است. با توجه به تاثیر موقعیت جغرافیایی، سن، جنس و رنگ پوست افراد در سطح سرمی 25-OH Vitamin D توصیه می گردد، هر آزمایشگاه با اندازه گیری غلظت 25-OH Vitamin D افراد سالم منطقه، مقادیر طبیعی مرجع خود را تعیین و از آن برای تفسیر نتایج استفاده نماید.

ویژگی‌های اختصاصی کیت

۱. حساسیت: حداقل غلظت قابل اندازه گیری 25-OH Vitamin D که از نمونه فاقد آنالیت قابل تمایز باشد را حساسیت گویند. این مقدار که بر اساس میانگین غلظت استاندارد صفر بعلاوه دو برابر انحراف معیار محاسبه گردیده است (**بدست آمده از ۱۰ تست**)، ۵ ng/ml می‌باشد.

۲. صحت: غلظت 25-OH Vitamin D، ۲۳۱ نمونه تصادفی با کیت دیازیست و روش مرجع (HPLC) اندازه‌گیری شد. نتایج بدست‌آمده از مقایسه دو روش ضریب همبستگی خطی (r) ۰/۸۸ را نشان می‌دهد. غلظت نمونه‌ها با کیت دیازیست بین ۶/۴ ng/ml تا ۷۵/۸ و با روش مرجع ۸/۴ ng/ml تا ۷۴/۹ بود. نتایج مقایسه دو روش به شرح زیر است:

روش	تعداد نمونه	غلظت نمونه‌ها (ng/ml)	Intercept	Slope
Passing/Bablok	۲۳۱	۶-۸۰	-۰/۴۷	۰/۹۹
Linear Regression	۲۳۱	۶-۸۰	۳/۶۹	۰/۸۷

۳. دقت: شاخص دقت این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP5-A2) [۲۳] ارزیابی گردیده است. بدین منظور میزان 25-OH Vitamin D ۳ نمونه سرمی با غلظت‌های مختلف اندازه‌گیری و انحراف معیار و ضریب تغییرات محاسبه گردید که در جدول زیر آمده است:.

شماره نمونه	تعداد سنجش	میانگین غلظت (ng/ml)	Within Run		Total	
			SD	٪CV	SD	٪CV
۱	۶۰	۱۱/۷۷	۰/۶۵	۵/۵۷	۰/۹۸	۸/۳۶
۲	۶۰	۲۵/۹۵	۱/۳۶	۵/۳۱	۲/۰۰	۷/۷۲
۳	۶۰	۵۶/۲۸	۲/۱۰	۳/۷۴	۲/۷۵	۴/۸۹

۴. خطی بودن: به منظور بررسی صحت اندازه‌گیری نمونه‌های با غلظت بالای ULoQ (upper limit of quantitation) تست خطی بودن این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP34)[۲۴] انجام گردید. بدین منظور نمونه سرم با غلظت ۱۷۰/۲ ng/ml با پلاسمای انسانی فاقد 25-OH Vitamin D به صورت متوالی رقیق شد. سپس غلظت‌ها با کیت 25-OH Vitamin D اندازه‌گیری گردید. درصد ریکاوری رقت که شاخص میزان دقت رقت گیری می باشد، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\frac{\text{غلظت اندازه‌گیری شده (ng/ml)}}{\text{غلظت مورد انتظار (ng/ml)}} \times ۱۰۰$$

(محدوده درصد ریکاوری بدست آمده بین ۹۴/۲ تا ۱۰۴/۲ است)

رقت	غلظت مورد انتظار (ng/ml)	غلظت اندازه‌گیری شده (ng/ml)	٪ ریکاوری
۱:۲	۵۴/۸۷	۵۷/۱۷	۱۰۴/۲
۱:۴	۲۸/۶۸	۲۷/۸۱	۹۷/۰
۱:۸	۱۵/۵۹	۱۴/۶۸	۹۴/۲
۱:۱۶	۹/۰۵	۸/۷۱	۹۶/۲