

اهمیت بالینی

۲۵- هیدروکسی ویتامین D شکل اولیه ویتامین D بوده که در کبد سنتز می‌شود. این متابولیت، فرم غالب در حال گردش ویتامین D است و به‌عنوان یک شاخص دقیق از وضعیت کلی ویتامین D فرد در نظر گرفته می‌شود. با انتقال ۲۵- هیدروکسی ویتامین D به کلیه‌ها و انجام آخرین مرحله هیدروکسیلاسیون، فرم فعال (۲۵-دی-هیدروکسی ویتامین D) حاصل می‌شود که نقش حیاتی در کنترل متابولیسم استخوان دارد. ویتامین D علاوه بر ایفای نقش‌های مهم در هموستاز کلسیم و متابولیسم معدنی استخوان، در تمایز سلولی، تنظیم عملکرد سیستم ایمنی بدن و پیشگیری از ابتلا به برخی از سرطان‌ها نیز موثر است. کمبود ویتامین D باعث بسیاری از بیماری‌ها از جمله پوکی استخوان، نرمی استخوان، سرطان و بیماری‌های قلبی و عروقی می‌شود. این کیت برای اندازه‌گیری کمی غلظت ویتامین D در سرم انسان به روش الایزا کاربرد دارد.

اصول آزمایش

کیت ۲۵- هیدروکسی ویتامین D بر اساس الایزای رقابتی طراحی شده است. در ابتدا نمونه‌های سرم، استانداردها و کنترل‌ها به همراه معرف آزادکننده در چاهک‌ها ریخته می‌شود. در زمان انکوباسیون اول، ویتامین D از پروتئین‌های اتصالی جدا شده و به آنتی‌بادی‌های تثبیت شده در کف چاهک متصل می‌شود. پس از تخلیه و شستشوی چاهک‌ها، ویتامین D کونژوگه شده با آنزیم HRP اضافه می‌شود و به جایگاه‌های خالی آنتی‌بادی در کف چاهک متصل می‌گردد. پس از انجام

شستشو و با اضافه کردن محلول سوبسترای آنزیم HRP رنگ آبی تشکیل شده که با افزودن محلول متوقف‌کننده تبدیل به رنگ زرد می‌گردد. محصول نهایی تولید شده در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را 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

۱) کالیبراتورها (Calibrators):

شامل شش ویال کالیبراتور با غلظت‌های ۲، ۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۱۲۰ ng/mL.

۲) محلول کونژوگه آنزیمی (Vitamin D Enzyme Conjugate) ۱۱ میلی‌لیتر:

یک ویال شامل محلول ویتامین D نشان‌دار شده با آنزیم HRP.

۳) معرف آزادکننده (Vitamin D Releasing Agent) ۱۱ میلی‌لیتر:

یک ویال حاوی معرف آزادکننده که ویتامین D را از پروتئین‌های اتصالی آزاد می‌کند.

۴) پلیت ۹۶ تستی:

یک میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی آنتی‌بادی تثبیت شده ضد ویتامین D که به‌همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی بسته‌بندی شده است.

۵) محلول شستشو غلیظ (Wash Buffer-50X) ۲۰ میلی‌لیتر:

یک ویال حاوی سورفکتانت محلول در بافر فسفات.

۶) محلول سوبسترا A (Substrate A) ۶/۵ میلی‌لیتر:

یک ویال محلول تترا متیل بنزیدین (TMB).

۷) محلول سوبسترا B (Substrate B) ۶/۵ میلی‌لیتر:

یک ویال محلول هیدروژن پراکساید (H2O2).

۸) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution) ۱۲ میلی‌لیتر:

یک ویال حاوی محلول متوقف‌کننده واکنش.

۹) سرم کنترل (Vitamin D Control):

ویال(های) حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر سرم کنترل.

۱۰) برچسب مخصوص پلیت:

یک ورق.

توجه ۱: کلیه اجزای کیت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود. محلول متوقف‌کننده را می‌توان در دمای اتاق نگهداری کرد.

توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در برگه COA درج شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت

۱) دستگاه خوانش گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).

۲) سمپلر کالیبره.

۳) آب مقطر دیونیزه.

موارد احتیاط در استفاده از کیت

- این کیت برای انجام تست‌های تشخیصی در محیط‌های آزمایشگاهی کاربرد دارد. محتویات کیت منشاء سرم انسانی داشته و از نظر عدم وجود HBsAg و آنتی‌بادی‌های ضد HIV1/2 و HCV کنترل شده‌اند، اما از آنجا که هیچ روشی به‌طور صددرصد نمی‌تواند منفی بودن این موارد را تأیید نماید، بنابراین لازم است هنگام استفاده از کیت، مراقبت‌های لازم به عمل آورده شود.

- محتویات تعبیه شده در این کیت برای استفاده در همین سری ساخت بوده و از استفاده مشترک با سایر سری ساخت‌ها خودداری فرمایید.

- برای دریافت نتایج بهتر و دقیق‌تر فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ چاهک‌ها رعایت شود. این فاصله زمانی نباید به گونه ای باشد که منجر به اثر دریفت (drift) گردد. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل این نکته حائز اهمیت است. دقت نمایید محلول‌ها نزدیک به ته چاهک ریخته شوند.

- شستشوی نامناسب می‌تواند باعث بوجود آمدن نتایج اشتباه در آزمایش شود.

- کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از استفاده از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است خودداری نمایید.

جمع آوری و تهیه نمونه‌ها

- نمونه مورد استفاده در این آزمایش سرم انسانی می‌باشد که از خون سیاهرگی تهیه شده و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا می‌گردد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده

تأثیرگذار خواهد بود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.

- نگهداری سرم باید در لوله‌های در بسته انجام شود. 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 محلول‌ها

محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از ویال محلول شستشو (50X) را با ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید. محلول آماده شده را 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.

محلول سوبسترا: قبل از شروع استفاده از کیت، کل حجم محلول رنگزا B (ویال روشن) را داخل محلول رنگزا A (ویال تیره) خالی نمایید و برای انجام تست تا پایان مصرف کیت استفاده نمایید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

مراحل انجام تست

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کلیه ویال‌های کالیبراتور، کنترل و نمونه‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت نمایید.

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، نمونه‌های بیمار و کنترل‌ها را در داخل چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول آزادکننده ویتامین D به تمامی چاهک‌ها اضافه نمایید. پلیت را به‌مدت ۳۰ - ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید.

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

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.

منابع

1. Holick, MF. Vitamin D Status: Measurement, Interpretation and Clinical Application. Ann Epidemiol. 2009, 19(2):73 - 78
2. Morris H. A. Vitamin D: A Hormone for All Seasons-How Much is enough? Clin. Biochem. Rev., 2005, 26, 21-32.
3. Bikle D. D. Vitamin D and the skin. J. Bone Miner. Metab., 2010, 28, 117-30.
4. Zerwekh J. E. Blood biomarkers of vitamin D status. Am. J. Clin. Nutr. 2008, 87, 1087S-91S.
5. Moyad M. A. Vitamin D: a rapid review. Dermatol Nurs., 2009, 21, 25-30.

در صورت بروز هرگونه مشکل با بخش پشتیبانی شرکت تینا پژوهان آروین تماس حاصل فرمایید.

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

DIAPLUS
شرکت تینا پژوهان آروین
سهروردی شمالی، پایین تر از آپادانا،
کوچه فیروزه، پلاک ۳ واحد ۱ و ۲
تلفن: ۰۲۱-۴۱۷۹۶۰۰۰

Recovery

در این تست دو نمونه سرم به‌نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به‌عنوان یک نمونه، مقدار ویتامین D در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش Bias < 10% است.

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	% Rec
1	9.1	27.3	18.2	19.6	107.6
2	39.3	83.4	61.3	62.5	101.9
3	33.1	109.2	71.15	70.6	99.2

Linearity

در این تست مقدار ویتامین 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)	1/2	1/4	1/8	1/16
Bias %					
1	19.4	2.7	-2.4	1.6	-2.1
2	32.1	2.3	-0.9	-1.5	2.4
3	108.3	3.3	2.7	2.8	-1.3

Cross Reactivity

اختصاصیت این آزمایش با کمک اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مداخله‌گر به سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین مقدار ماده مداخله‌گر به مقدار ویتامین D مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب سنجش شد.

Analyte	Cross Reactivity
25-OH vitamin D2	1.000
25-OH vitamin D3	1.000
vitamin D2	0.007
vitamin D3	0.004
1,3,25-(OH)3 vitamin D2	1.900
1,3,25-(OH)3 vitamin D3	1.150

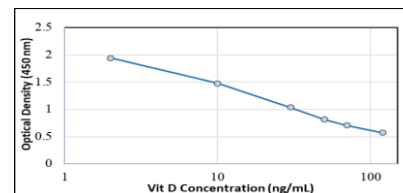
Interferences

ترکیبات زیر در واکنش اندازه‌گیری ویتامین 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

Sensitivity

بر اساس جمع میانگین جذب نوری کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف معیار، حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت ۲/۱ ng/mL می‌باشد.



نکته: جذب نوری به‌دست آمده از کالیبراتورها و همچنین منحنی فوق فقط به‌عنوان مثال ذکر شده و در هر آزمایشگاهی در هر مرتبه آزمایش باید منحنی جدیدی ترسیم گردد.

مقادیر مورد انتظار برای تست الیزای ویتامین D

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به‌قرار زیر مشخص کرده است. هرچند؛ این مقادیر برای هر آنالیت باید توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

Levels	Concentration (ng/mL)
Deficient	< 20
Insufficient	20 - 29
Sufficient	30 - 100
Potential Toxicity	>100

پارامترهای کنترل کیفی

Intra - Assay

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش CV < 10% است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean Vit D (ng/mL)	11.3	45.5	83.1
SD (ng/mL)	0.67	3.4	4.9
C.V (%)	5.9	7.4	5.8

Inter - Assay

دقت بین‌تستی با ارزیابی نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با غلظت‌های متفاوت در چهار نوبت کاری (هر نوبت پنج بار تکرار) بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش CV < 10% است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean Vit D (ng/mL)	9.8	44.1	79.4
SD (ng/mL)	0.66	3.9	5.1
C.V (%)	6.7	8.8	6.4

(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 آماده شده، (بخش آماده‌سازی محلول‌ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

(۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

(۷) پلیت را به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید. محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت یا اسپیراسیون تخلیه کنید و مطابق بند ۵ شستشو دهید.

(۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترای آماده شده (بخش آماده‌سازی محلول‌ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و چاهک‌ها را به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت خودداری فرمایید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول سوبسترا را به‌مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

(۱۰) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۲۰-۱۵ ثانیه به‌آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

(۱۱) شدت جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید (از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). در این آزمایش از روش 4PL (یا Logic-log) برای محاسبه غلظت استفاده نمایید. 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	1.90	1.94	2
	B1	1.98		
Cal. B	C1	1.467	1.475	10
	D1	1.483		
Cal. C	E1	1.021	1.034	30
	F1	1.047		
Cal. D	G1	0.814	0.804	50
	H1	0.794		
Cal. E	A2	0.707	0.704	70
	B2	0.701		
Cal. F	C2	0.574	0.571	120
	D2	0.568		