

مرحله 6- انکوبه کردن: پلیت را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و به مدت 30 دقیقه در دمای انکوباتور 37 درجه سانتیگراد انکوبه نمایید.

مرحله 7- شستشو: پلیت را 5 مرتبه و با حجم 300-350 میکرولیتر شستشو دهید. در هر مرحله اجازه دهید محلول شستشو به مدت 20-40 ثانیه درون چاهک ها باقی بماند. در انتهای شستشو با ضربه زدن آرام پلیت بر روی دستمال نمگیر یا کاغذ جاذب ، رطوبت باقی مانده را خارج نمایید.

مرحله 8- ایجاد رنگ : 100 میکرولیتر از محلول سوبسترا-رنگزا (TMB) به کلیه چاهک ها اضافه نمایید.

مرحله 9- انکوباسیون: پلیت را به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق و به دور از نور انکوبه نمایید. واکنش بین رنگزا وHRP باعث ایجاد رنگ آبی در چاهک های استاندارد (به جز استاندارد صفر) و نمونه های حاوی Vit D می شود.

مرحله 10- اضافه کردن محلول متوقف کننده واکنش: 50 میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش را با استفاده از سمپلر چند کاناله یا به روش دستی به همه چاهک ها اضافه نمایید و به آرامی مخلوط کنید. رنگ آبی بعد از افزودن محلول متوقف کننده به رنگ زرد تغییر خواهد کرد.

مرحله 11- خوانش : پلیت را با فیلتر 450 نانومتر و فیلتر رفرانس 630 نانومتر خوانش نمایید. (توجه: مقدار جذب نوری را حداکثر تا 10 دقیقه پس از توقف واکنش اندازه گیری نمایید.)

روش شستشو:

•برای دستیابی به نتایج درست و دقیق، روش شستشوی مناسب ضروری است. بنابراین توصیه می شود از یک دستگاه شستشو کننده پلیت الایزا با کیفیت خوب استفاده کنید. برای پیشگیری از ایجاد واکنش های مثبت کاذب و رنگ زیاد زمینه، توصیه می شود شستشو در هر مرحله از روند آزمایش ، به تعداد 5 مرتبه با حجم 300 تا 350 میکرولیتر محلول شستشو ترجیحا توسط سیستم اتوماتیک در هر چاهک انجام شود.

•بعد از انکوباسیون، برای جلوگیری از آلودگی های متقاطع پلیت با نمونه ها یا کونژوگه-HRP، محتویات چاهک ها را دور نریزید بلکه اجازه دهید دستگاه شستشو کننده پلیت (ELISA Washer) ، به طور اتوماتیک آنها را آسپیره کند.

•مطمئن شوید که کانال های توزیع کننده مایع در شستشو کننده پلیت، گرفتگی یا آلودگی نداشته باشند و حجم کافی از بافر شستشو هر بار در چاهک ها ریخته شود. •بافر شستشوی غلیظ را قبل از استفاده باید به نسبت 1/20 رقیق کرد. اگر از همه چاهک های یک پلیت استفاده نمی کنید، حجم متناسبی از محلول را تهیه نمایید.

محاسبه نتایج :

جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه خوانشگر الایزا در طول موج 450 و 630 نانومتر خوانش نمایید.

با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها وغلظت آن ها، نمودار نقطه- به- نقطه (Point-to-point) رسم کنید. به طوری که جذب نوری استاندارد روی محور عمودی Y و غلظت آن روی محور افقی X برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد به دست آورده و سپس به یکدیگر وصل نموده و منحنی استاندارد را از طریق ترسیم خطوطی که از نقاط تلاقی محورهای Y وX عبور کرده باشد، رسم کنید تا منحنی به دست آید.

•میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محورY جای آن را پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه به دست آمده خطی عمود بر محورافقی X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، به دست آید.

•در صورتی که ازاسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت استفاده می کنید جهت محاسبه نتایج و ترسیم منحنی کالیبراسیون به دستورالعمل دستگاه مراجعه نمایید.

مقادیر طبیعی:

مقادیر نرمال Vit D درسرم افراد طبیعی که توسط تست های مکرر به روش الایزا به دست آمده به شرح زیر می باشد ، ولی پیشنهاد می گردد هر آزمایشگاهی مقادیر نرمال بازه مرجع خود را بدست آورد:

محدوده طبیعی (ng/ml)	Level
< 10	Deficient
10-30	Insufficient
31-70	Preferred Level
71-100	Hi Level
> 100	Potential Toxicity

ویژگی های اختصاصی کیت:

حساسیت (Sensitivity):

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و دو برابر انحراف معیار(SD)، حداقل غلظت Vit D قابل تشخیص در این کیت 4 ng/ml می باشد.

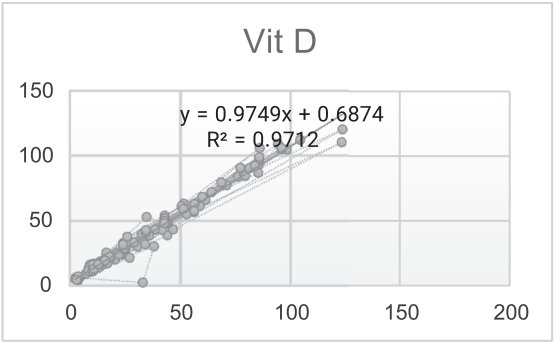
اختصاصیت(Specificity):

نتایج اختصاصیت این کیت برروی نمونه هایی با غلظت های مختلف از مواد زیر که واکنش های متقاطع ایجاد می کنند به شرح زیر می باشد:

میزان تداخل (%)	آنالیت مداخله کننده
102.4	25-OH Vitamin D3
100	25-OH Vitamin D2
< 0.1	1,25(OH)2 Vitamin D3
6	1,25(OH)2 Vitamin D2
3.8	Vitamin D3
< 0.5	Vitamin D2

صحت(Accuracy):

جهت بررسی صحت آزمایش، تست همبستگی بر اساس پروتکلCLSI (EP29-A) به طور همزمان بر روی 120 نمونه سرم در سطوح مختلف با روش مرجع (HPLC) و کیت Vit D Gold Medi Test Plus انجام گردید. نتایج این بررسی ها همبستگی حدود 97.1% را نشان می دهد.



دقت (Precision):

شاخص دقت این کیت برمبنای استاندارد CLSI(EP5-A2) ارزیابی گردیده است. بدین منظور میزان Vit D , 3 نمونه با غلظت های مختلف اندازه گیری و انحراف معیار و ضریب تغییرات محاسبه گردید که در جدول زیر آمده است:

Within-run Precision	SD	%CV	میانگین	تعداد	Batch	Panel Member
7.18	1.11	15.46	20	1	1	1
2.16	1.09	50.53	20	1	1	2
1.08	1.09	100.53	20	1	1	3

Between-run Precision	SD	%CV	میانگین	تعداد	Batch	Panel Member
6.06	0.88	14.51	20	1	1	1
2.66	1.3	49.11	20	1	1	2
1.15	1.13	98.36	20	1	1	3

خطی بودن (Linearity):

برای این منظور از استاندارد 120 ng/ml توسط استاندارد 0، رقت های مختلف تهیه و هر نمونه سه مرتبه تکرار گردید. نتایج به شرح زیر می باشد:

میزان رقت	مقدار مورد انتظار (ng/ml)	مقدار به دست آمده (ng/ml)			میانگین (ng/ml)	Recovery (%)	Bias (%)
0%	0	0.008	0.01	0.03	0.02	NA	NA
8.3%	10	9.6	9.5	10	9.70	97.00	-3
16.6%	20	19.6	19.6	21	20.07	100.33	0.35
33.3%	40	42	40.5	41.3	41.27	103.17	3.17
66.6%	80	79.6	79	79.2	79.27	99.08	-0.91
100%	120	123	120	120.4	121.13	100.94	0.94

تست بازیابی (Recovery Test):

تست بازیابی یا Recovery روشی برای تشخیص خطاهای سیستماتیک مربوط به نمونه و همچنین بررسی پایداری نمونه پس از جمع آوری به کار می رود. یک نمونه عادی یک بار در شرایط اولیه خود و بار دیگر پس از اضافه نمودن غلظت مشخصی از یک آنالیت به نمونه، مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرد. اختلاف بین دو مقدار اضافه شده و اندازه‌گیری شده در محاسبه بازیافت مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای این منظور از استاندارد 120 ng/ml به عنوان استاندارد پایه استفاده شد و چهار غلظت 10 ,20 , 40 و 80 به استاندارد پایه اضافه شد.

مقدار افزوده شده (ng/ml)	مقدار مورد انتظار (ng/ml)	غلظت بازیافت شده (ng/ml)	ریکاوری (%)
10	65	62	95.38
20	70	72	102.8
40	80	79	98.75
80	100	103	103

اثر هوک (Hook Effect):

در این کیت تا غلظت 10000 ng/ml، اثر هوک دیده نشد.

منابع و مراجع:

1-armas LAG,Hollis M ,Heaney RP. Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. J. Clin.Endocrinol. Metao.2004;89(11)538791-2.houghton LA,Vleth R.the case against ergocalciferol(vitamin D2) as a vitamin supplement . Am.J. Nutur.2006;84,694697-.
3.Holick M. Vitamin D: the underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health. Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes 2002; 9(1)8798-4.pliz S.et al.Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in older persons and the risk of nursing home admission.AM.J.Clin.Nutur.2006;84(3)616622-.
5. Souberbielle JC.Et al. Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: Recommendations for clinical practice.

خلاصه محتویات اصلی کیت:

از این خلاصه فقط جهت اشاره ای به محتویات کیت استفاده کنید و هنگام انجام آزمایش همیشه از صفحه مبسوط روش پیروی نمایید.

پلیت	Microwell Plate	1 x 96 wells
کنترل ها	Control Vials	2 x 0.5 ml
استاندارد ها	Calibration Curve Standards	5 x 0.5 ml
کونژوگه آنزیمی غلیظ	Conjugate (11x)	1 x 0.75ml
محلول بیوتین	Biotin Reagent	1 x 7 ml
رقیق کننده کونژوگه	Conjugate Diluent	1 x 7 ml
بافر شستشو	Wash Buffer	1 x 30 ml
محلول سوبسترا-رنگزا	Chromogen Substrate	1 x 12 ml
محلول متوقف کننده واکنش	Stop Solution	1 x 6 ml

خلاصه مراحل انجام آزمایش

افزودن نمونه ها و کنترل ها و استاندارد ها 25 میکرولیتر
افزودن محلول کونژوگه رقیق شده 50 میکرولیتر
انکوبه کردن 60 دقیقه، دمای 37°
افزودن محلول بیوتین 50 میکرولیتر

انکوبه کردن 30 دقیقه، دمای 37°
شستشو 5 مرتبه
افزودن محلول سوبسترا - رنگزا 100 میکرولیتر
انکوبه کردن 15 دقیقه، دمای اتاق و تاریکی
توقف واکنش 50 میکرولیتر
خوانش جذب 450 نانومتر یا 630/450 نانومتر

نمادها :

	شرایط نگهداری 2-8 درجه سلسیوس		هشدار
	شماره ساخت		تاریخ انقضاء
	دستورالعمل استفاده		تاریخ تولید
	تولیدکننده		محتویات کیت (تعداد) آزمایش
	خطر زیستی		از خوردن و آشامیدن خودداری شود
	شماره کاتالوگ		لیاس محافظت کننده و محافظ چشم بیوشید
	ProCin™ 300 S phrases: S26-S28-S67/S28-45-60-61 R phrases: 43		برای استفاده خارج از بدن

شماره بازیابی : 02 - 1403

تاریخ انتشار : اردیبهشت ماه 1404

تهران، جاده قدیم کرج، جاده شهریار، بعد از شهرک سعید آباد، حسن آباد خالصه، مجتمع علمی صنعتی عصر انقلاب ، خیابان دانش، خیابان فناوران، نیش خیابان نانوفناوری، شرکت آریا مینا تشخیص

وب سایت: www.aryamabna.com

کدپستی: 3313193685

تلفن: 66512800(10 خط)

۱۲

۱۱

۱۰

۹

۸