

25 - OH Vitamin D ELISA KIT
کیت کمی تعیین مقدار ویتامین D

IVD
چاهک ۹6%
1064 REF

لطفا قبل از انجام آزمایش بروشور کیت به طور کامل و با دقت مطالعه شود.از دستورالعمل های انجام آزمایش کیت پیروی کنید و آن ها را تغییر ندهید.فقط با رعایت کامل این دستورالعمل ها می توان از کیت الایزا 25-OH Vit D Gold Medi Test Plus نتایج درست و صحیح بدست آورد.

هدف از استفاده:

کیت 25-OH Vit D Gold Medi Test Plus به روش الایزا جهت اندازه گیری کفی Vit D در نمونه سرم/پلاسما انسان کاربرد دارد. این کیت فقط برای IVD (In Vitro Diagnostic) و جهت استفاده در آزمایشگاه های تشخیص پزشکی کاربرد دارد .

خلاصه:

ویتامین D یک ویتامین حلال در چربی است و دارای ساختار استروئیدی می باشد که تنظیم کلسیم بدن را از روده و کلسیم هموستاز انجام می دهد. دو نوع مهم ویتامین D عبارتند از : D3(Cholecalciferol) وD2(Ergocalciferol) که هر دو نوع ساختار ایزومری دارند و D2 از نظر بیولوژیک، فعالیت کمتری دارد. D3 فقط از طریق موادغذایی به بدن وارد نمی شود بلکه از طریق تابش خورشید به پوست بدن به وسیله مولکول های Dehidrochlosterin تولید می شود در حالیکه D2 بیشتر به وسیله غذاهای گیاهی وارد بدن می شود که کلا کمتر از 5% مجموع ویتامین D بدن را تشکیل می دهد. در داخل کبد ویتامین D هیدروکسید شده و تبدیل به 25-OH-D می شود که بزرگترین ذخیره ویتامین D بدن می باشد. غلظت 25-OH-D در ماه های زمستان پایین تر می باشد. همچنین افرادی که پوست تیره دارند و یا افراد مسن مقدار این ویتامین در بدنشان کمتر است. استفاده از دوز بالای ویتامین D خطر تولید Neonatal Hypercalcemia را در پی دارد.

اساس آزمایش:

اساس این آزمایش به روش رقابتی است. در این روش چاهک ها توسط آنتی بادی ضد ویتامین Dپوشش داده می شوند. سپس نمونه بیماران به چاهک ها افزوده شده و با اضافه کردن بافر استخراج عمل جداسازی ویتامین D در سرم انجام می شود. سپس محلول بیوتین کونژوگه که حاوی کمپلکس Biotin-Ag می باشد افزوده شده که با ویتامین Dجدا شده از سرم توسط بافر استخراج بر سر چسبیدن به آنتی بادی ضد ویتامین Dپوشش داده شده در کف پلیت رقابت می کند . در ادامه محلول استرپتو اویدین کونژوگه که حاوی کمپلکس Streptoavidin-HRP می باشد، اضافه می شود که به کمپلکس Biotin-Ag متصل شده و کمپلکس Streptoavidin-HRP-Biotin ایجاد می کند. پس از شستشو ، با افزودن سوپسترانژکا (TMB) به داخل چاهک ها، رنگ آبی ایجاد می شود. با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می شود. شدت رنگ ایجاد شده با غلظت ویتامین دی موجود در نمونه نسبت عکس دارد.

قرائت نتایج با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در طول موج 450 نانومتر (با فرانس 630 نانومتر) انجام می گیرد.

محتویات کیت:

توجه: معرف های موجود در این کیت حداکثر برای آزمایش 88 نمونه در یک سری آزمایش کافی است.

1.پلیت: یک پلیت، دارای 96 چاهک پوشش داده شده با آنتی بادی ضد Vitamin Dدر پوشش آلومینیومی همراه با رطوبت گیر بسته بندی شده است. چاهک ها یا نوارهای استفاده نشده را همراه با رطوبت گیر در کیسه پلاستیکی زیپ دار که برای نگهداری آن ها تدارک دیده شده است، قرار دهید و در یخچال به دمای 2-8 درجه سانتیگراد برگردانید. پلیت پس از باز شدن، به مدت 2 ماه در دمای 2-8 درجه سانتیگراد پایدار است.

2.سری استانداردها: کیت شامل شش ویال استاندارد آماده مصرف حاوی آنالیت Vitamin D با غلظت های 0,10,20,40,80,120 ng/ml در بافر حاوی پروتئین می باشد. حجم تمامی استاندارد ها 0.5 ml می باشد.

3.سرم کنترل ها (Control Serums) : کیت حاوی یک ویال سرم کنترل پایین (Low Control) دارای مایعی زرد رنگ و کنترل بالا (High Control) دارای مایعی زرد رنگ با حجم 0.5 ml و با غلظت مشخص شده بر روی برچسب ویال می باشد.

ویال های کنترل آماده مصرف می باشند.

4.بیوتین کونژوگه (Biotin-Conjugate) : محلول آبی رنگ با حجم 1.5 ml می باشد. قبل از استفاده باید با بافر استخراج به نسبت 1 به 21 رقیق شود(21X) .

پس از باز شدن درب ویال به مدت 2 ماه در دمای 2-8 درجه سانتیگراد پایدار می باشد.

5.استرپتو اویدین - HPR Streptoavidin-HPR در بافر پروتئینی به همراه نگهدارنده): محلول قرمز رنگ استرپتواویدین نشاندار شده با آنزیم HRP ، با حجم 12 ml و آماده مصرف می باشد. پس از باز شدن درب ویال به مدت 2 ماه در دمای 2-8 درجه سانتیگراد پایدار می باشد.

6.بافر استخراج (Extraction Buffer) : مایعی زرد رنگ با حجم 24 ml می باشد و پس از باز شدن درب ویال به مدت 2 ماه در دمای 2-8 درجه سانتیگراد پایدار می باشد.

7.محلول سوپسترا - رنگزا (TMB Substrate) : محلول سوپسترانژکا حاوی تترا متیل بنزدین و آب اکسیژنه، مایعی بی رنگ در یک ویال قهوه ای با حجم 12ml آماده مصرف بوده و پس از باز شدن درب ویال به مدت 2 ماه در دمای 2-8 درجه سانتیگراد پایدار است.

8.بافر شستشو (Wash Buffer) : مایعی بی رنگ با حجم 40 ml می باشد. قبل از استفاده باید با آب مقطر یا آب دیونیزه به نسبت 1 به 25 رقیق شود. پس از رقیق سازی به مدت یک هفته در دمای اتاق، یا به مدت 2 ماه در صورت نگهداری در دمای 2-8 درجه سانتیگراد پایدار است.

9.محلول متوقف کننده واکنش (Stop Solution) : مایعی بی رنگ که حاوی محلول اسید سولفوریک رقیق شده 0.5 مولار و آماده مصرف با حجم 12 ml می باشد. پس از باز شدن درب ویال، به مدت 2 ماه در دمای 2-8 درجه سانتیگراد پایدار است.

10.یک عدد کیسه پلاستیکی زیپ دار : جهت نگهداری نوارهای استفاده نشده

11.دو برگ برچسب : مخصوص پلیت جهت پوشاندن چاهک ها در مدت انکوباسیون و جلوگیری از تبخیر یا آلودگی چاهک

12.بروشور کیت

مواد و وسایل لازم که در کیت موجود نمی باشند:

1-سمپلرهای 25 ، 100، 200 و 1000 میکرولیتری دقیق،(درصورت امکان سمپلر

کاناله با قابلیت برداشت 25 تا 200 میکرولیتر و یا دیسپنسر اتوماتیک)

2-آب مقطر یا آب دیونیزه تازه (ترجیحا با هدایت الکتریکی مطلوب)

3-دستگاه خوانشگر پلیت دارای فیلتر 450 نانومتری و 630 نانومتری به عنوان فیلتر فرانس

4-دستمال جاذب رطوبت یا پارچه تمیز

5-دستگاه واشر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر 8 کاناله که قادر به ریختن 350 میکرولیتر محلول شستشو باشد. (سیستم آسپیراسیون / شستشوی چاهک)
6-دستکش یک بار مصرف

7-تایمر

8-ظروف زباله مناسب برای مواد بالقوه آلوده شده

9-سر سمپلر یک بار مصرف

احتیاط و ایمنی:

1.آزمایش های الایزا به زمان و دما حساس هستند. برای پرهیز از ایجاد نتایج اشتباه، دقیقا از مراحل روش آزمایش بدون اعمال تغییر پیروی کنید.
2.معرف های مربوط به شماره ساخت های مختلف را با یکدیگر استفاده ننمایید و همچنین از استفاده محلول های کیت تجاری دیگر پرهیز نمایید.
محتویات این کیت دقیقا برای اجرای آزمایش به نحوه مطلوب فقط برای همین کیت فراهم شده اند.
3.مطمئن شوید که تمام معرف ها براساس آنچه برروی کیت و برای یک شماره ساخت بیان شده معتبر باشد. هرگز از معرف ها بعد از تاریخ انقضایی که برروی برچسب یا جعبه بیان شده استفاده نکنید.
4.توجه-مرحله مهم: اجازه دهید معرف ها و نمونه ها قبل از استفاده به دمای اتاق (2-30 درجه سانتیگراد) برسند. معرف ها را قبل از استفاده به آرامی تکان دهید. پس از استفاده فوراً به 2-8 درجه سانتیگراد بازگردانید.
5.آنگونه که در مراحل روش آزمایش بیان شده است، فقط از حجم کافی نمونه استفاده کنید. زیرا در غیر این صورت از حساسیت آزمایش کاسته خواهد شد.
6.کف خارجی چاهک ها را با دست لمس نکنید، اثر انگشت یا خراش می تواند در خواندن نتایج اختلال ایجاد نماید. در هنگام خواندن نتایج آزمایش از خشک بودن کف پلیت و فقدان حباب های هوا در داخل چاهک ها اطمینان حاصل نمایید.
7.هرگز نگذارید چاهک ها بعد از مرحله شستشو خشک شوند. فوراً مرحله ی بعدی را آغاز کنید. موقع افزودن معرف ها از تشکیل حباب های هوا اجتناب کنید.
8.از وقفه های طولانی مدت در مراحل آزمایش اجتناب کنید. از یکسان بودن شرایط کاری برای همه چاهک ها اطمینان حاصل کنید.
9.سمپلرها را در زمان مشخص کالیبر نمایید تا از درستی حجم نمونه ها/ معرف هایی که توزیع می کنید مطمئن شوید. از سرسمپلرهای جداگانه یک بار مصرف برای نمونه و معرف ها استفاده کنید تا از آلودگی های متقاطع جلوگیری شود.
10.هنگام افزودن نمونه ها، سرسمپلر با ته چاهک تماس پیدا نکند.
11.هنگام سنجش با خوانشگر پلیت ،جذب را در طول موج 450 نانومتر یا در 450/630 نانومتر اندازه گیری نمایید.

12.فعالیت آنزیمی HRP-کونژوگه ممکن است تحت تاثیر گرد و غبار و مواد شیمیایی فعال و موادی مثل هیپوکلریت سدیم، اسیدها، قلیاها و غیره قرار گیرد. آزمایش را در حضور این مواد انجام ندهید.

13.اگر از دستگاه تمام اتوماتیک استفاده می کنید، طی انکوباسیون پلیت ها را با برچسب مخصوص پلیت نپوشانید، همچنین می توان بعد از شستشو از خارج کردن ذرات باقیمانده داخل پلیت به وسیله ضربه آرام صرف نظر کرد.

14.فقط برای مصرف آزمایشگاهی (For In vitro diagnostic use) و توسط افراد حرفه ای صلاحیت دار می باشد.

15.همه نمونه های با منشاء انسانی باید بالقوه عفونی در نظر گرفته شوند. پیروی دقیق از مقررات GLP می تواند موجب اطمینان از ایمنی فردی شود.

16.به هنگام انجام آزمایش و جابجایی محلول ها از رویوش آزمایشگاه ، دستکش یک بار مصرف و وسایل حفاظت فردی استفاده کنید.

17.تمام معرف ها و مواد باقیمانده را با رعایت اصول ایمنی و مقررات قابل اجرا مدیریت نموده و امحا نمایید.

هشدار:

ممکن است در تهیه کنترل های کیت از موادی با منشاء انسانی استفاده شده باشد. این مواد با کیت های آزمایشگاهی دارای عملکرد قابل قبول آزمایش شده و نتیجه آزمایش برای وجود آنتی بادی های anti-HCV ، HIV½ و HBs Ag منفی بوده اند. اما هیچ روش آنالیتیکی وجود ندارد که بتواند از فقدان کامل عوامل عفونی در نمونه ها یا معرف ها اطمینان دهد. لذا تاکید می گردد با معرف ها و نمونه ها همچون عوامل انتقال دهنده بیماری های عفونی و با احتیاط بسیار رفتار کنید.
آلبومین سرم گاوی (BSA) و سرم های جنین گوساله (FCS) از حیواناتی از مناطق جغرافیایی free BEST/TCS گرفته شده اند.

18.با مواد شیمیایی و بیولوژیک باقیمانده مطابق با مقررات جاری GLP و مقررات محلی یا ملی رفتار نمایید.

19.قبل از دفع پسماندهای آلوده برای آلودگی زدایی؛ سر سمپلرها، ویال ها، نوارها و ظروف نمونه را جمع آوری کرده و حداقل به مدت 2 ساعت در دمای 121 درجه سانتیگراد اتوکلاو نموده یا به مدت 30 دقیقه در هیپوکلریت سدیم 10% قرار دهید. محلول های حاوی هیپوکلریت سدیم هرگز نباید اتوکلاو شوند. در صورت درخواست به برگه اطلاعات ایمنی مواد (MSDS) مراجعه شود.

20.هرگز در آزمایشگاه چیزی نخورید، نیاشامید، سیگار نکشید و لوازم آرایش به کار نبرید. هرگز محلول ها را با دهان پییبت نکنید.

21.برخی از معرف ها از جمله محلول متوقف کننده واکنش، محلول های رنگزا و بافر شستشو بصورت مواد خام ممکن است سمی، التهاب زا، سوزاننده و یا اثر سرطان زایی داشته باشند. از تماس پوست یا مخاط با این معرف ها اجتناب شود.
22.محلول متوقف کننده واکنش، اسید سولفوریک (H۲SO۴) نیم مولار (0.5M) است. با احتیاط از آن استفاده کنید. در صورت تماس با پوست یا چشم ها با آب فراوان شستشو دهید.

23.(0.1%) ProClin 300™ که به عنوان نگهدارنده استفاده شده است، می تواند باعث حساسیت پوستی شود. در صورت تماس با پوست یا چشم ها با آب فراوان شستشو دهید.

24.جهت کاهش پدیده تأخیری، با توجه به غلظت بالای محلول آنزیم کونژوگه شده به آنتی بادی ضد Vit D ، ضرورت دارد تعداد نمونه ها در تست حداکثر 3 ردیف باشد.

جمع آوری، حمل و نقل و نگهداری نمونه:

•جمع آوری نمونه:

1.نمونه را براساس روال عادی آزمایشگاه جمع آوری کنید. از نمونه های سرم یا پلاسمای تازه می توان برای آزمایش استفاده نمود. باید اجازه داد که خون گرفته شده از ورید بطور طبیعی و کامل لخته و سرم یا پلاسما حتی الامکان هرچه زودتر از لخته جدا شود تا از همولیز شدن گلبول قرمز اجتناب گردد. برای اطمینان از این که نمونه های سرم شفاف و بدون آلودگی میکروبی هستند باید توجه لازم را به کار برد. هرگونه ذرات قابل رویت در نمونه را باید با سانتریفوژ کردن در دور 3000 در دقیقه (RPM) به مدت 20 دقیقه دردمای اتاق یا با فیلتراسیون برطرف کرد.

2.از نمونه های جمع آوری شده از سرم و یا پلاسمای حاوی ضدانعقاد هپارین و EDTA می توان استفاده کرد.

3.از نمونه های لیپمیک، ایکتریک و همولیز نباید استفاده شود زیرا این نمونه ها می توانند موجب نتایج کاذب شوند. نمونه ها را توسط حرارت غیرفعال نکنید. این کار می تواند باعث افت آنتی ژن مورد نظر گردد. از نمونه های با آلودگی میکروبی قابل رویت هرگز نباید استفاده شود.

•حمل و نقل و نگهداری نمونه:

1.از انجماد و ذوب کردن مکرر نمونه ها بیش از 2 بار جلوگیری شود. نمونه های منجمد باید قبل از آزمایش به آرامی و به طور کامل مخلوط شده تا کاملاً یکنواخت و همگن گردند.
2.کیت Vit D Gold Medi Test Plus فقط برای آزمایش کردن نمونه های سرم یا پلاسما در نظر گرفته شده است. از این کیت برای آزمایش کردن نمونه جسد، بزاق، ادرار، خون مخلوط شده و یا سایر مایعات بدن استفاده نکنید.

3.نمونه ها را در دمای 2-8 درجه سانتیگراد نگهداری کنید. اگر آزمایش نمونه ها در فاصله 24 ساعت پس از نمونه گیری انجام نمی شود؛ جهت جلوگیری از آلودگی باکتریایی، نمونه ها را در فریزر و در دمای 20- تا 80- درجه سانتیگراد نگهداری نمایید. جهت ارسال و انتقال نمونه باید مطابق با مقررات محلی و بین المللی موجود برای حمل ونقل نمونه های بالینی و عوامل بیولوژیک عمل نموده و بسته بندی و برچسب گذاری مناسب انجام شود.

نگهداری و پایداری:

1.در صورت نگهداری در دمای 2-8 درجه سانتیگراد محتویات کیت تا تاریخ انقضای نوشته شده بر روی برچسب و جعبه کیت پایدار خواهند بود. از انجماد کیت یا اجزاء کیت خودداری نمایید.
2.محلول شستشو بهتر است روزانه و تازه تهیه شود و در همان روز مصرف شود.
3.تغییر در خصوصیات فیزیکی معرف ها؛ نظیر وجود ذرات معلق در آنها اغلب حاکی از آلودگی و خرابی معرف ها می باشد.
4.محلول سوپسترانژکا باید بی رنگ باشد. وجود رنگ آبی در این محلول نشان از خرابی و آلودگی آن دارد و قابل استفاده نمی باشد.
5.اجزاء کیت ها با سری ساخت متفاوت نباید با یکدیگر استفاده شوند و از جابه جایی درب معرف ها پرهیز شود.

نشانه های ناپایداری (افت) معرف ها:
خارج شدن مقادیر کنترل های Low و High کیت از محدوده ی ادعایی بیان شده، نشان دهنده احتمال افت معرف ها و یا خطای اپراتور یا تجهیزات مورد استفاده است. در چنین مواردی باید نتایج را نامعتبر در نظر گرفت و نمونه ها را دوباره آزمایش نمود. در صورتی که همچنان نتایج اشتباه بدست آید و علت آن افت یا ناپایداری معرف ها باشد، معرف ها را با معرف جدید فوراً جایگزین کنید یا برای دریافت راهنمایی بیشتر با پشتیبان فنی Gold Medi Test Plus تماس بگیرید.

آماده سازی معرف ها:

•اجازه دهید کیت و معرف ها به دمای اتاق (30-18 درجه سانتیگراد) برسند.
•آماده سازی محلول بیوتین کونژوگه : حجم 50 میکرولیتر از محلول بیوتین کونژوگه (21X) را به 1 میلی لیتر از محلول بافر استخراج اضافه نمایید. توجه کنید که در ابتدا به ازای هرچاهک 200 میکرولیتر محاسبه نموده و سپس حجم مورد نیاز برای انجام تست را به 1/21 رقیق نمایید. (به طور مثال برای 8 بیمار 100 میکرولیتر از محلول بیوتین کونژوگه را به 2ml بافر استخراج اضافه کنید.)

•تهیه محلول شستشو: برای تهیه محلول شستشو، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (25X) را با 24 حجم آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق نمائید. محلول شستشو به مدت یک هفته در دمای اتاق پایدار است.

•بافر شستشوی غلیظ را از نظر وجود کریستال نمک بررسی کنید. در صورت وجود کریستال با گرم کردن در 37 درجه سانتیگراد آنها را حل کنید.

•سایر معرف ها آماده مصرف هستند.

مراحل انجام آزمایش:

مرحله 1- آماده سازی : دو چاهک برای کنترل بالا و پایین و شش چاهک جهت استانداردها و به تعداد بیماران چاهک در نظر بگیرید و مابقی چاهک ها را به همراه رطوبت گیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آن را ببندید. پیشنهاد می گردد استانداردها را به صورت دوتایی آزمایش کنید.

مرحله 2- افزودن نمونه: 25 میکرولیتر از نمونه ها، استانداردها و کنترل ها درون چاهک ها اضافه نمایید.

توجه: برای هریک از استانداردها ،کنترل ها و نمونه ها از سر سمپلر جداگانه استفاده شود تا از آلودگی جلوگیری گردد.

مرحله 3- بافر استخراج و بیوتین : 200 میکرولیتر از مخلوط بافر استخراج و بیوتین کونژوگه آماده شده را به تمامی چاهک ها اضافه نموده و پلیت را به مدت 30 ثانیه به آرامی و به صورت ضربه ای شیک نمایید.

مرحله 4- انکوبه کردن: پلیت را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و به مدت 45 دقیقه در دمای اتاق (30-18 درجه سانتیگراد) انکوبه نمایید.

مرحله 5- 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 6- افزودن استرپتو اویدین-HRP : 100 میکرولیتر از کونژوگه-HRP را به تمامی چاهک ها اضافه نموده و پلیت را به مدت 30 ثانیه به آرامی و به صورت ضربه ای شیک نمایید.

۶

۵

۴

۳

۲

۱

Gold medi® test plus

E I A D I A G N O S T I C K I T

THE EIA DIAGNOSTIC KIT FOR 96 TESTS

مرحله 7- انکوباسیون: پلیت را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و به مدت 20 دقیقه در دمای اتاق (30-18 درجه سانتیگراد) قرار دهید.

مرحله 8- شستشو: مطابق با روش مرحله 5، محتویات چاهک ها را خالی نمایید و عمل شستشو را انجام دهید.

مرحله 9 – ایجاد رنگ : 100 میکرولیتر از محلول سوبسترا-رنگزا (TMB) به کلیه چاهک ها اضافه نمایید.

مرحله 10 – انکوباسیون: پلیت را به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق و به دور از نور انکوبه نمایید. واکنش بین رنگزا و HRP باعث ایجاد رنگ آبی در چاهک های استاندارد (به جز استاندارد صفر) و نمونه های حاوی Vit D می شود.

مرحله11 - اضافه کردن محلول متوقف کننده واکنش: 100 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 12- خوانش : پلیت را با فیلتر 450 نانومتر و فیلترفرانس 630 نانومتر خوانش نمایید. (توجه: مقدار جذب نوری را حداکثر تا 15 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 نریزد 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 یافر شستشو هر بار در چاهک ها ریخته شود. •بافر شستشوی غلیظ را قبل از استفاده باید به نسبت 1/25 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
< 20	Deficient
21-30	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 3.2 ng/ml می باشد.

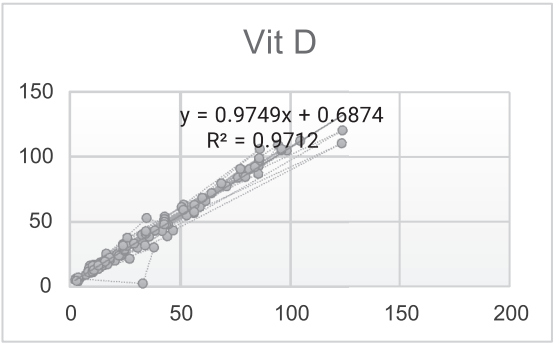
اختصاصیت(Specificity):

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 پروتکل(CLSI (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 ng/ml، 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-ightful 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	6 x 0.5 ml
بیوتین کونژوگه	Biotin Conjugate	1 x 1.5 ml
استرپتواویدین کونژوگه	StreptoAvidin-HRP	1 x 12 ml
بافر استخراج	Extraction Buffer	1 x 24 ml
بافر شستشو	Wash Buffer	1 x 40 ml
محلول سوبسترا-رنگزا	Chromogen Substrate	1 x 12 ml
محلول متوقف کننده واکنش	Stop Solution	1 x 12 ml

خلاصه مراحل انجام آزمایش

افزودن نمونه ها و کنترل ها و استاندارد ها 25 میکرولیتر

افزودن مخلوط بیوتین کونژوگه و بافر استخراج 200 میکرولیتر

انکوبه کردن

45 دقیقه،دمای اتاق

شستشو

افزودن استرپتواویدین - HRP

انکوبه کردن

20 دقیقه،دمای اتاق

شستشو

افزودن محلول سوبسترا - رنگزا

انکوبه کردن

15 دقیقه،دمای اتاق و تاریکی

توقف واکنش

100 میکرولیتر

خوانش جذب

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 ببوشید
	ProCin™ 300 9 phrases: S26-28-36/77-58-45- 60-61 R phrases: 43		برای استفاده خارج از بدن

شماره بازبینی : 01 - 1402

تاریخ انتشار : اردیبهشت ماه 1402

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)

ایمیل: info@aryamabna.com