کیت رادیوایمونواسی برای تعیین غلظت ۲۵–هیدروکسی ویتامین دی–۳ در سرم انسانی

25-Hydroxyvitamin-D3 RIA Kit in Human Serum

مقدمه

ویتامین-دی نوعی سکواستروئید می باشد. این ویتامین دارای دو شکل شیمیایی مجزا (ویتامین D2 و D3) می باشد که از نظر بیولوژیکی دارای اثرات یکسان می باشند. ویتامین D2 یک ملکول ۲۸ کربنی است که از ارگوسترول گیاهی مشتق می شود. در حالیکه ویتامین D3 یک ملکول ۲۷ کربنی است و از کلسترول مشتق می گردد. شکل فعال بیولوژیکی ویتامین-دی در گردش خون، مشتق ۲۵ هیدروکسیله آن می باشد. وقتی ویتامین-دی وارد بدن انسان می شود، در کبد هیدروکسیله شده و به شکل فعال آن تبدیل می شود. مشتق ۲۵ هیدروکسیله ویتامین-دی، شکل عمده ذخیره ویتامین-دی در بدن می باشد. لذا تعیین غلظت 25-OH-Vitamin D3 در سرم، نشانگر اولیه سطح این ویتامین در بدن می باشد.

اساس روش اندازه گیری

کیت رادیوایمونواسی 25-Hydroxyvitamin D3 موجود بر اساس سنجش ایمونولوژیکی رقابتی تهیه شده است. در این کیت از روش پوشش آنتی بادی استفاده شده است. 25-OH-Vitamin D3 موجود در نمونه ها برای اتصال به آنتی بادی منوکلونال ضد 25-OH-Vitamin D3 که برروی لوله پوشش داده شده است، با 25-OH-Vitamin D3-Biotin رقابت می کند. پس از زمان انکوباسیون، لوله ها تخلیه می شوند. سپس استرپت آویدین متصل به ید-۱۲۵ به لوله ها اضافه می شود. پس از زمان انکوباسیون، لوله ها تخلیه شده و شستشو داده می شوند. اکنون اکتیویته موجود در هر لوله توسط شمارنده گاما اندازه گیری می شود که این اکتیویته بطور معکوس با غلظت 25-OH-Vitamin D3 در نمونه ها متناسب است. استانداردهای 25-OH-Vitamin D3 با غلظت مشخص، همراه با نمونه های مجهول آزمایش می شوند که بر اساس منحنی استاندارد مقدار شمارش در مقابل غلظت 25-OH-Vitamin D3 ، غلظت نمونه های مجهول بدست می آید.

معرف ها

۱- لوله های پوشش داده شده: شامل ۱۰۰ لوله که با آنتی بادی ضد 25-OH-Vitamin D3 تهیه شده در گوسفند پوشش داده شده اند.

۲- استانداردها : ۶ ویال نیم میلی لیتری از استاندارد با غلظت های ۰، ۴، ۱۰، ۲۵، ۶۰ و ۱۲۰ براساس ng/ml که در سرم نرمال انسانی تهیه شده و از تیومرسال بعنوان نگهدارنده استفاده شده است.

۳- بافر استخراج : یک ویال ۲۵ میلی لیتری.

۴- کونژوگه بیوتینه غلیظ (Biotin- 25-OH-Vitamin D3) (50X) : یک ویال نیم میلی لیتری که برای تهیه بافر استخراج آماده مصرف لازم است این محلول به نسبت ۱/۵۰ با بافر استخراج رقیق شود.

۵- سرم کنترل: دو ویال نیم میلی لیتری آماده مصرف.

۶- ردیاب (استرپت آویدین متصل به ید-۱۲۵) : یک ویال ۲۵ میلی لیتری آماده مصرف.

۷- محلول شستشو دهنده غلیظ (20X) : یک ویال ۵۰ میلی لیتری محلول شستشو که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف لازم است این محلول به نسبت ۱/۲۰ با آب دیونیزه رقیق شود.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست

۱- سمپلر ۲۵، ۲۰۰ و ۲۰۰۰ میکرولیتری دقیق

۲- آب دیونیزه

۳- شیکر مخصوص گاما

۴- گاما کانتر

۵- کاغذ جاذب رطوبت

نکات قابل توجه برای مصرف کنندگان

۱- از استفاده از مواد پس از تاریخ انقضاء خودداری کنید و از مخلوط کردن یا استفاده از کیت ها با شماره بچ مختلف پرهیز نمائید.

۲- درب ظروف را پس از استفاده ببندید و از تعویض درب ها جدا خودداری کنید.

۳- از لباس و دستکش یکبار مصرف هنگام کار با مواد رادیواکتیو استفاده کنید.

۴- لوازم آزمایشگاهی آلوده به مواد رادیواکتیو جداگانه و با روش های ایمن (براساس دستورالعمل های حفاظت در برابر اشعه) شستشو و یا پسماند نمایید.

۵- کیت های باز نشده پس از تحویل باید در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد (یخچال) نگه داری شوند. لوله ها باید در کیسه در بسته به همراه ماده جاذب رطوبت نگه داری شود. کیت باید تا تاریخ انقضا استفاده شود. برای اطلاع از تاریخ انقضا به برچسب کیت مراجعه شود.

۶- فرآیند شستشو خیلی مهم است. شستشوی ناکافی باعث کاهش دقت و افزایش کاذب شمارش می شود.

تهیه و جمع آوری نمونه

۱- آزمایش را باید بر روی نمونه های سرمی انجام داد. نمونه های شدیدا همولیزه و دارای چربی باید حذف شوند.

۲- نمونه ها را می توان برای دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد و برای زمان های طولانی تر (تا سی روز) در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمود.

۳- از انجماد و ذوب مکرر نمونه ها باید خودداری کرد.

آماده سازی معرف ها

۱- کلیه معرف ها را به دمای اتاق برسانید. قبل از استفاده آنها را به آرامی تکان دهید (سر و ته نمائید).

۲- برای تهیه بافر استخراج آماده مصرف، در یک ظرف شیشه ای تمیز، یک حجم از کونژوگه بیوتینه غلیظ (50X) را با ۴۹ حجم بافر استخراج رقیق نمائید. برای هر بار آزمایش این محلول باید تازه تهیه شود. این محلول بلافاصله پس از تهیه همراه به دو دقیقه شیک، بایستی مصرف شود.

ردیف	تعداد لوله های مورد استفاده	حجم بافر استخراج (زرد رنگ) (mL)	حجم کونژوگه بیوتینه (قرمز رنگ) (µL)
۱	ده عدد	۳	۶۰
۲	بیست عدد	۶	۱۲۰
۳	چهل عدد	۱۰	۲۰۰
۴	شصت عدد	۱۴	۲۸۰
۵	هشتاد عدد	۱۸	۳۶۰
۶	یکصد عدد	۲۲	۴۴۰

۳- برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب دیونیزه رقیق نمائید.

روش انجام آزمایش

۱- تعداد لوله های کوت شده برای استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار را انتخاب کنید.

۲- ۲۵ میکرولیتر از استانداردها، سرم کنترل و نمونه های بیمار را به داخل هر لوله بریزید.

۳- ۲۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج آماده مصرف را به تمام لوله ها اضافه کنید.

۴- لوله ها را بمدت ۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات آنها خوب مخلوط شوند. سپس لوله ها را بمدت ۶۰ دقیقه در همزن گردان مخصوص شرکت پادتن گستر ایثار یا در شیکر افقی (با دور 280rpm) و در درجه حرارت اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتیگراد) انکوبه کنید.

۵- محتویات لوله ها را از طریق مکش یا وارونه کردن تخلیه نمائید. سپس لوله ها را دو بار و هر بار با دو میلی لیتر محلول شستشوی آماده مصرف شستشو دهید. برای اطمینان از تخلیه کامل، با وارونه نگهداشتن لوله ها برروی کاغذ جاذب و با ضربت ملایم برروی لوله تمامی مایع موجود در لوله ها را تخلیه کنید

۶- ۲۰۰ میکرولیتر از ردیاب را به تمام لوله ها اضافه کنید. سپس لوله ها را بمدت ۳۰ دقیقه در همزن گردان مخصوص شرکت پادتن گستر ایثار یا در شیکر افقی (با دور 280rpm) و در درجه حرارت اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتیگراد) انکوبه کنید.

۷- محتویات لوله ها را از طریق مکش یا وارونه کردن تخلیه نمائید. سپس لوله ها را دو بار و هر بار با دو میلی لیتر محلول شستشوی آماده مصرف شستشو دهید. برای اطمینان از تخلیه کامل، با وارونه نگهداشتن لوله ها برروی کاغذ جاذب و با ضربت ملایم برروی لوله تمامی مایع موجود در لوله ها را تخلیه کنید.

۸- با استفاده از گاما کانتر، اکتیویته موجود در لوله ها بمدت یک دقیقه شمارش کنید.

محاسبه نتایج

۱- با استفاده از میانگین شمارش استانداردها (محور Y) و غلظت مشخص آنها (محور X) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استانداردی رسم کنید.

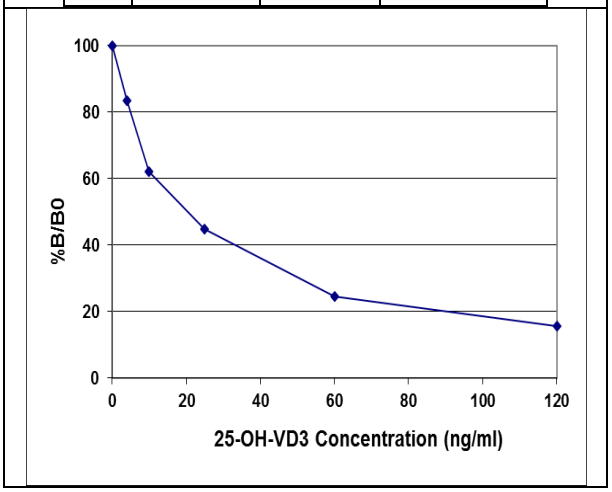
۲- میانگین شمارش برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

۳- با استفاده از کامپیوتر این محاسبات ساده خواهد شد.

راهنمای محاسبه

مقادیر شمارش ارائه شده در جدول ذیل تنها بعنوان راهنمایی آورده شده است و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید بدست آورد.

No.	Standard Con. (ng/mL)	Count (CPM)	B/B0(%)
	Total Count	203884	-
1	0	109748	100
2	4	91741	83.5
3	10	68359	62.2
4	25	49113	44.7
5	60	26968	24.5
6	120	17079	15.6



مقادیر طبیعی

بدلیل اختلافات سنی، نژادی و رژیم تغذیه، نمی توان برای تمام جمعیت ها محدوده مرجع تعیین کرد. بنابراین هر آزمایشگاه باید محدوده مرجع خود را گزارش نماید. مقادیر طبیعی در سرم افراد نرمال که توسط آزمایشات مکرر با این روش بدست آمده است به قرار زیر می باشد:

غلظت ویتامین D3 (ng/ml)	سطح دریافت
کمتر از ۱۰	کمبود
۱۰ - ۳۰	ناکافی
۳۰ - ۷۰	کافی
۷۰-۱۰۰	بیش از حد نرمال
بیشتر از ۱۰۰	سمی

برای تبدیل به واحد به شرح ذیل می توان عمل کرد:

$$ng/ml \times 2.5 = nmol/L$$

خصوصیات کیت

۱- حساسیت

با رقیق سازی متوالی استاندارد ۴ با سرم صفر، حساسیت این کیت برای تعیین مقدار هورمون 25-OH-VitaminD3 برابر ۱ ng/ml بدست آمد.

۲- دقت

برای محاسبه میزان دقت در یک روز و روزهای مختلف، آزمایش بر روی ۳ نمونه سرم ۲۰ بار تکرار شد که ضریب تغییرات به شرح ذیل است.

ضریب تغییرات در روز

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
1	20	5.5	0.36	6.5
2	20	42.5	1.91	4.5
3	20	74.5	2.86	3.8

ضریب تغییرات در روزهای مختلف

نمونه سرم	دفعات تکرار	میانگین (ng/ml)	انحراف معیار	ضریب تغییرات (%CV)
1	10	8.4	0.63	7.5
2	10	33.4	2.17	6.5
3	10	81.4	4.48	5.5

۳- ویژگی

از مواد زیر برای بررسی میزان تداخل این کیت استفاده شد.

نوع ماده	درصد تداخل
25-OH-VitaminD3	100
25-OH-Vitamin D2	100
Vitamin D3	< 0.04
Vitamin D2	< 0.05