| IVD-REF: PS - Vit D | پیشگامان سنجش<br>پیشگام در سنجش و نوآوری | کیت الایزا ۲۵-هیدراکسی ویتامین دی |
|---|---|---|
| Ver. No: 05 | | Vitamin D ELISA KIT |

| معرف | ۴۸ تستی | ۹۶ تستی | ۱۹۲ تستی | آماده سازی |
|---|---|---|---|---|
| پلیت پوشیده شده با آنتی بادی علیه ۲۵-هیدروکسی ویتامین D | 1×48 wells | 1×96 wells | 2×96 wells | آماده مصرف |
| کالیبراتور۱-۵ در ماتریکس سرم حیوانی به همراه نگهدارنده(۰، ۱۰، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ نانوگرم در میلی لیتر) | 5 ×0.5 mL | 5×0.5 mL | 5 ×1.0 mL | آماده مصرف |
| نمونه کنترل تهیه شده در سرم حیوانی عاری از ۲۵-هیدروکسی ویتامین D( بازه سرم کنترل ها برروی برچسب قید شده است) | 2 ×0.5 mL | 2 ×0.5 mL | 2 ×1.0 mL | آماده مصرف |
| کونژوگه آنزیمی غلیظ×11 | 1 ×0.5 mL | 1 ×0.75 mL | 1×1.5 mL | با رقیق کننده کونژوگه به نسبت 1:11 مخلوط شود |
| رقیق کننده کونژوگه(آبی رنگ) | 1 ×3 mL | 1 ×7.0 mL | 1×13 mL | به نسبت 11:1 با کونژوگه آنزیمی غلیظ مخلوط گردد. |
| محلول بیوتین(۲۵-هیدروکسی ویتامین D متصل به بیوتین در ماده نگهدارنده): زرد پررنگ | 1 ×3 mL | 1 ×7.0 mL | 1×13 mL | آماده مصرف |
| محلول شستشو غلیظ | 1 ×30 mL | 1 ×30 mL | 1 ×50 mL | به نسبت ۱ به ۲۰ با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید |
| محلول سوبسترا-رنگ زا(تترامتیل بنزدین و آب اکسیژنه) | 1 ×6.0 mL | 1 ×12.0 mL | 2 ×12.0 mL | آماده مصرف |
| محلول توقف( اسید کلریدریک ۱ مولار) | 1 ×6.0 mL | 1 ×6.0 mL | 1×12.0 mL | آماده مصرف |

| IVD-REF: PS - Vit D | پیشگامان سنجش<br>پیشگام در سنجش و نوآوری | کیت الایزا ۲۵-هیدراکسی ویتامین دی |
|---|---|---|
| Ver. No: 05 | | Vitamin D ELISA KIT |

**کاربرد:**

کیت **25(OH) vitamin D** شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس برای اندازه گیری کمی ۲۵-هیدروکسی ویتامین D در سرم یا پلاسما به روش الایزا طراحی گردیده است.

**مقدمه :**

ویتامین D ،ویتامینی محلول در چربی است که وظیفه حفظ و تأمین کلسیم و فسفر در خون را از طریق تقویت جذب آنها از مواد غذایی موجود در روده و تقویت بازجذب آنها در کلیه برعهده دارد. حفظ غلظت مناسب کلسیم و فسفر در خون برای تقویت استخوان سازی و تأمین غلظت مناسبی از کلسیم و فسفر در استخوان ها به منظور استحکام بیشتر استخوان ها ضروری است.

دو فرم اصلی ویتامین D در بدن انسان ، ویتامین $D_3$ (کوله کلسیفرول) و ویتامین $D_2$ (ارگوکلسیفرول) می باشد. از سایر فرم های ویتامین D میتوان به متابولیک های هیدروکسیله این دو ماده نیز اشاره دارد. ویتامین D2 به وسیله منابع غذایی تأمین می شود. از آنجایی که فقط ماهی و برخی غذاهای دریایی از نظر ویتامین $D_2$ غنی هستند، اغلب ویتامینD فرآهم آورده شده از راه غذا در جوامع صنعتی از مواد غذایی غنی شده با ویتامین D نظیر شیر، کره گیاهی، روغن سویا و سایر روغنهای خوراکی گیاهی تأمین می گردد.

ویتامین $D_3$ در پوست و متعاقب تابش اشعه خورشید به ویژه پرتوهای فرابنفش نوع (UVB)B تولید می شود. در این فرآیند ۷-دهیدروکسی کلسترول با اشعه فرابنفش B واکنش داده و ویتامین $D_3$ یا کوله کلسیفرول تولید می شود. قرار گرفتن در معرض تابش نور خورشید به مدت روزانه ۱۰ الی ۱۵ دقیقه و حداقل ۲ بار در هفته برای ساخت مقادیر لازم ویتامین D کافی است. رنگدانه ملانین موجود در پوست مثل یک فیلتر نوری در پوست عمل می کند، از این رو افراد دارای پوست تیره در مقایسه با افراد دارای پوست روشن به زمان بیشتری از تابش نور خورشید برای ساخت مقادیر یکسان ویتامین D احتیاج دارند.

ویتامین D تولید شده در پوست یا مصرفی از راه مواد غذایی، در کبد و کلیه طی دو مرحله هیدروکسیلاسیون به ترتیب به ۲۵-هیدروکسی ویتامین D و ۱و۲۵-دی هیدروکسی ویتامین D یا کلسیتریول تبدیل می شود. ۱و ۲۵-دی هیدروکسی ویتامین D شکل فیزیولوژیک فعال ویتامین D محسوب می شود. دی هیدروکسی ویتامین D نیمه عمر کوتاهی دارد(۴ تا ۶ ساعت) و مقدار آن در پلاسما تقریباً یک هزارم ۲۵-هیدروکسی ویتامین D می باشد. ۲۵-هیدروکسی ویتامین D نیمه عمر بالایی داشته(۲ تا ۳ هفته) و اندازه گیری آن کم تر تحت تأثیر تغییرات روزانه، تابش نور خورشید و مصرف مواد غذایی حاوی ویتامین D قرار دارد، به همین دلیل متخصصین علوم بالینی و انجمن های علمی، اندازه گیری آن را به عنوان معیار تعیین سطح سلامت ویتامین D پذیرفته اند.

کمبود ۲۵-هیدروکسی ویتامین D متعاقب مواردی نظیر مصرف ناکافی در مواد غذایی، دوری از اشعه خورشید، سوءجذب، اختلالات کبدی و کلیوی، مصرف داروهای ضد تشنج مانند فنی توئین و فنوباربیتال (به دلیل افزایش متابولیسم کبدی ویتامینD ) و تعدادی از اختلالات ارثی متابولیک مشاهده می شود. نوزادان تحت تغذیه با شیرمادر، گیاهخوارانی که شیر و تخم مرغ مصرف نمی کنند، افراد دارای پوست تیره و افراد مسن گروه های در معرض خطر کمبود ویتامین D هستند.کمبود آن باعث کاهش مواد معدنی استخوان ها و متعاقب آن نرمی استخوان ها می گردد. این پدیده در کودکان به راشیتیسم و در بالغین به استئومالاسی منتهی می شود. کمبود ویتامین D همچنین باعث پوکی استخوان یا استئوپروز می گردد. پیام رسانی ویتامین D به داخل سلول در آپوپتوز(Apoptosis یا مرگ برنامه ریزی شده سلول) تکثیر و تمایز سلول نقش دارد، لذا کمبود آن می تواند با وقوع سرطان در کولون، پستان و پانکراس ارتباط داشته باشد. کمبود ویتامین D احتمال ابتلا به فشار خون( به دلیل افزایش تولید رنین) و خطر حملات قلبی را افزایش می دهد. مونوسیت ها ،ماکروفاژها و لنفوسیت های T و B فعال شده توانایی سنتز فرم فعال ویتامینD را به دلیل وجود آنزیم ۱-آلفا هیدروکسیلاز دارند و فعالیت آنزیمی در آنها برخلاف آنزیم کلیوی تحت تأثیر مقدار کلسیم خون و هورمون پاراتیروئید نمی باشد. ویتامینD از طریق تأثیر بر لنفوسیت های T تنظیمی در پیشگیری از بیماری های اتوایمیون نظیر MS و دیابت نوع I نقش دارد.

## اساس آزمایش :

مبنای کیت سنجش ۲۵-هیدروکسی ویتامین D شرکت تولیدی- تحقیقاتی پیشگامان سنجش ایساتیس بر پایه اصول الایزا رقابتی-اشباعی می باشد. در این روش، استاندارد یا کنترل یا نمونه سرم بیمار همزمان با محلول استخراج کننده و استرپتاویدین کونژوگه با آنزیم HRP به چاهک های پوشیده شده از آنتی بادی مونوکلونال علیه ۲۵-هیدروکسی ویتامین D اضافه می شود. مولکول های ۲۵- هیدروکسی ویتامین D موجود در نمونه بیمار یا استاندارد یا کنترل پس از جدا شدن از پروتئین های اتصالی به آنتی بادی های پوشیده در چاهک متصل می شود. پس از ۶۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بدون شستشو ۲۵-هیدروکسی ویتامین D بیوتینیله به محیط اضافه می شود. هرچه مقدار ۲۵-هیدروکسی ویتامین D موجود در نمونه بیمار بیشتر باشد، جایگاه های بیشتری از آنتی بادی پوشیده برروی فاز جامد را اشغال کرده و مقدار کمتری ۲۵-هیدروکسی ویتامین D بیوتینیله فرصت اتصال به فاز جامد را پیدا می کند. ۲۵-هیدروکسی ویتامین D بیوتینیله از طریق بیوتین به استرپتاویدین-HRP متصل شده و سپس اجزای اتصال نیافته طی شستشو از محیط خارج و با افزودن محلول سوبسترا - رنگزا و انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه رنگ آبی ظاهرمی شود. با افزودن محلول متوقف گر، واکنش آنزیمی متوقف می گردد

و در نهایت شدت جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری می شود. شدت رنگ تولید شده با مقدار ۲۵-هیدروکسی ویتامین D موجود در نمونه نسبت معکوس دارد.

## مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

۱. سمپلرهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری دقیق. سمپلر ۸ کاناله با قابلیت پیپتینگ ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر و یا دیسپنسر اتوماتیک، اگرچه ضروری نیست ولی باعث بهبود قابل توجه تکرارپذیری و صحت نتایج می گردد.

۲. آب مقطر با هدایت کمتر از ۱ $\mu S/cm$

۳. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر مرجع.

۴. کاغذ رطوبت گیر

۵. دستگاه واشر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر ۸ کاناله یا سرنگ که قادر به ریختن ۳۵۰ میکرولیتر محلول شستشو باشد.

## نگهداری کیت :

۱. کیت پس از تحویل باید در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد (یخچال) نگهداری شود. کلیه معرف ها و اجزاء کیت تا تاریخ انقضاء مندرج برروی جعبه کیت به شرط نگهداری در دمای یادشده پایدار هستند. ***هرگز فراتر از تاریخ انقضاء مندرج برروی جعبه از کیت استفاده نکنید.***

۲. غلظت کالیبراتورها بر روی ویال درج شده است و ممکن است بین شناسه های مختلف ساخت تفاوت داشته باشد.

۳. از انجماد اجزاء کیت خودداری نمایید.

۴. ***محلول کاری کونژوگه تازه تهیه شده باید ظرف حداکثر ۳۰ دقیقه مصرف شود. اکیداً توصیه می شود کونژوگه کاری به اندازه ای تهیه شود که در زمان یادشده مصرف شود و مابقی آن دور ریخته شود.***

۵. میکروپلیت باید در کیسه به همراه رطوبت گیر نگهداری شود. در هنگام استفاده ***پس از رسیدن دمای کیسه میکروپلیت به دمای اتاق***، تعداد لازم استریپ را را از کیسه آلومینیومی خارج و مابقی همراه نم گیر بلافاصله به کیسه منتقل و درب کیسه با دقت بسته و به یخچال منتقل گردد.

۶. محلول شستشو باید روزانه و تازه تهیه شود و در همان روز تهیه مصرف شود.

۷. تغییر در خصوصیات فیزیکی معرف ها نظیر وجود ذرات معلق در آنها اغلب حاکی از آلودگی و خرابی معرف ها می باشد

۸. محلول سوبسترا-رنگ زا باید بی رنگ باشد. وجود رنگ آبی در این محلول نشان از خرابی و آلودگی آن دارد و باید دور ریخته شود.

۹. کیت های باز شده اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شوند، حداکثر به مدت ۸ هفته پایدار خواهند بود.

۱۰. اجزاء هر شناسه ساخت، شامل معرف ها و کالیبراتورها فقط در صورت استفاده با یکدیگر به پاسخ صحیح منتهی می شوند، لذا اجزاء کیت ها با سری های ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابه جایی درب معرف ها جلوگیری شود.

۱۱. استفاده از سر سمپلر یکبار مصرف برای دقت و صحت و پرهیز از آلودگی برای برداشتن نمونه ها، استانداردها و کنترل ها ضروری است.

## جمع آوری و آماده سازی نمونه:

۱. سرم یا پلاسمای EDTA نمونه مناسب برای این آزمایش است.

۲. از نمونه های با کدورت بالا، همولیز یا لیپمیک ترجیحاً استفاده نشود.

۳. در صورتی که انجام آزمایش در همان روز جمع آوری نمونه امکان پذیر نباشد، نمونه ها را می توان برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگه داری کرد. برای مدت طولانی تر از ۴۸ ساعت نمونه ها دردر دمای $20\ ^0C$- سانتیگراد شود.

۴. از ذوب و انجماد مکرر نمونه ها اجتناب شود. نمونه های منجمد باید قبل از آزمایش به آرامی، به طور کامل مخلوط شده تا کاملاً یکنواخت و همگن گردد.

## احتیاطات و هشدارها

۱. کیت فقط برای تشخیص طبی آزمایشگاهی کاربرد دارد.

۲. کلیه معرف های کیت برای سنجش مستقیم ۲۵-هیدروکسی ویتامینD سرم یا پلاسمای EDTA استانداردسازی شده اند و برای سنجش ۲۵-هیدروکسی ویتامینD سایر مایعات بیولوژیک یا پلاسمای غیر EDTA مناسب نمی باشد.

۳. قبل از آغاز سنجش، دستورالعمل پیش رو را به دقت مطالعه نموده و اطمینان حاصل کنید که تمامی نکات آن را بخوبی فراگرفته اید. همواره از ویرایش معتبر و به روز دستورالعمل که همراه کیت بسته بندی شده است، استفاده کنید.

۴. کلیه جوانب ایمنی دراجرای آزمایش رعایت شود. برای آگاهی از احتیاطات لازم به "راهنمای اصول کلی حفاظت و پیشگیری از آلودگی کارکنان و محیط آزمایشگاه ( روش های صحیح میکروب شناسی وتکنیک های صحیح آزمایشگاهی )" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش ۱۳۹۳ مراجعه نمایید.

۵. از تماس تمام معرف ها به ویژه محلول توقف که حاوی اسید کلریدریک است با پوست جلوگیری شود. در صورت تماس با آب و صابون شستشو داده شود.

۶. با کلیه نمونه های بیمار به عنوان نمونه های بالقوه عفونی برخورد نمایید.

۷. در این کیت برای ساخت برخی اجزا از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر آنتی بادی علیه HIV-1 and 2 و HCV و آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B(HBsAg) ، منفی گزارش شده اند، ولی از آنجایی که هیچ آزمایشی نمی تواند به طورکامل ایمنی یک نمونه با منشاء انسانی را تضمین نماید، با آن همانند یک نمونه بالقوه عفونی رفتار نمایید.

۸. در ساخت برخی اجزا کیت از سرم حیوانی استفاده شده که از نظر BSE( آنسفالیت گاوی پریونی) منفی گزارش شده است، ولی با این وجود با آنها همانند نمونه های بالقوه عفونی برخورد شود.

۹. برخی از معرف ها حاوی سدیم آزاید به عنوان نگهدارنده می باشند. سدیم آزاید ممکن است با سرب و مس موجود در لوله کشی آب شهری واکنش داده و تولید آزایدهای فلزی قابل انفجار کند. جهت آگاهی از نحوه برخورد با پس ماندهای آزمایشگاهی به "دستورالعمل نحوه مدیریت پسماندهای آزمایشگاهی" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش ۱۳۹۴ مراجعه نمایید.

## آماده سازی معرف ها:

۱. همه معرف ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (۲۷-۲۰درجه سانتیگراد) برسند.

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

۳. تهیه محلول کاری کونژوگه: در یک لوله تمیز و ترجیحاً یک بار مصرف ابتدا محلول رقیق کننده کونژوگه و سپس محلول کونژوگه غلیظ ×۱۱ را با نسبت 1:11 اضافه نمایید. به عنوان مثال به ۱ میلی لیتر محلول رقیق کننده کونژوگه ۱۰۰ میکرولیتر کونژوگه ×۱۱ اضافه نمایید. درب ویال را با پارافیلم بسته و با چندین بار سروته

کردن لوله بخوبی آن را مخلوط نمایید. جدول زیر به عنوان راهنمای تهیه محلول کونژوگه می تواند مورد استفاده قرار گیرد:

| حجم محلول رقیق کننده کونژوگه (میلی لیتر) | حجم کونژوگه ×۱۱ (میکرو لیتر) | تعداد استریپ |
| --- | --- | --- |
| ۱ | ۱۰۰ | ۲ |
| ۲ | ۲۰۰ | ۴ |
| ۳ | ۳۰۰ | ۶ |
| ۴ | ۴۰۰ | ۸ |
| ۵ | ۵۰۰ | ۱۰ |
| ۶ | ۶۰۰ | ۱۲ |

یادآوری ۱: به دلیل حساسیت محلول کونژوگه به آلودگی های مختلفی که در اثر شستن لوله های شیشه ای در آزمایشگاه با شوینده های و سفیدکننده ها ایجاد می شود، ***توصیه می شود جهت رقیق سازی از لوله های یک بارمصرف پلاستیکی استفاده شود.***

یادآوری ۲: محلول رقیق کننده کونژوگه حاوی ترکیباتی است که ممکن است در سرما رسوب می کند. لذا توصیه می شود، تهیه محلول کاری کونژوگه ***بعد از رسیدن دمای محلول رقیق کننده کونژوگه به دمای اتاق ( حداقل ۳۰ دقیقه قبل از رقیق سازی) و مخلوط کردن کامل آن صورت پذیرد.***

### نکات مهم در انجام تست:

۱. فرایند شستشو از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. شستشوی ناکافی باعث عدم جداشدن پیوندهای غیراختصاصی و جذب نوری زمینه (Background) می گردد.

۲. کیفیت آب مقطر مصرفی در کیفیت محلول شستشو و جدا کردن پیوندهای غیراختصاصی اهمیت زیادی دارد.

۳. در مواردی که مقدار ۲۵-هیدروکسی ویتامین D نمونه بیش از 120 ng/ml باشد، نمونه را با استاندارد صفر رقیق نموده و سپس آزمایش را تکرار نموده و ضریب رقت را در محاسبه نهایی منظور نمایید.

۴. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.

۵. دمای مطلوب محیط آزمایشگاه برای آزمایش های الایزا ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتیگراد می باشد.

۶. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.

۷. بهتراست استانداردها، کنترل ها و نمونه ها را به صورت دوتایی(Duplicate) و ترجیحاً در دو چاهک عمودی آزمایش کنید و میانگین جذب نوری دو چاهک جهت محاسبه نتایج مورداستفاده قرار گیرد.

۸. جهت پیپت کردن محلول سوبسترا-رنگ زا و محلول متوقف گر از میکروپیپت های حاوی ***قطعات فلزی استفاده نکنید.***

۹. زمان انکوباسیون و دمای انکوباسیون را با دقت رعایت کنید. حداکثر دامنه قابل قبول دمای انکوباسیون$37\pm1°C$ و زمان انکوباسیون $5\%\pm$ می باشد.

۱۰. جهت اجتناب از خطا در نتایج آزمایش (افت نتایج در چاهک انتهایی نسبت به چاهک های ابتدایی) پیپت کردن اولین استاندارد تا آخرین نمونه نباید بیش از ۱۰ دقیقه به طول انجامد. پس توصیه می شود، در صورتی که فاقد تجهیزاتی نظیر سمپلر ۸ کاناله یا دیسپنسر هستید، بیش از ۵ استریپ در هر ران آزمایش نکنید.

۱۱. در هر بار انجام آزمایش منحنی کالیبراسیون را مجدد ترسیم نموده و برای محاسبه نتایج از منحنی ذخیره شده استفاده نکنید.

۱۲. مراحل آزمایش را بدون وقفه انجام دهید. وقفه بین مراحل باعث نتایج کاذب می گردد.

۱۳. پس از هر مرحله پیپتینگ ،چاهک ها از نظر وجود حباب بررسی شوند. در صورت وجود حباب با ضربه آهسته به پلیت حباب ها را از محیط خارج کنید.

**روش انجام آزمایش:**

۱- تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه رطوبت گیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.

۱. محلول کاری کونژوگه را طبق دستورالعمل آماده سازی معرف ها تهیه کنید.

۲- ۲۵ میکرولیتر از استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار به داخل هر چاهک بریزید.

۳- ۵۰ میکرولیتر از محلول کاری رقیق شده کونژوگه ، به تمام چاهک ها اضافه کنید.

۴- پلیت را بمدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها به خوبی مخلوط شوند. سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا به مدت ۶۰ دقیقه در دمای $37\pm1°C$ انکوبه کنید.

۵- پلیت را از انکوباتور خارج، برچسب پلیت را برداشته و ***بدون شستشو*** به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول بیوتین بیافزایید و مجدداً بمدت ۶۰ ثانیه به آرامی تکان دهید و درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و پلیت را برای مدت ۳۰ دقیقه دیگر در دمای $37\pm1°C$ انکوبه نمایید.

۶- محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را طبق دستورالعمل زیر شستشو دهید:

- برای شستشوی چاهک ها، ابتدا ۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک ها را وارونه کرده و همراه با تکان دادن خالی کنید و عمل شستشو را چهار بار دیگر )جمعاً به مدت ۵ بار( تکرار کنید. در انتهای شستشو، با ضربه زدن ملایم پلیت بر روی کاغذ جاذب رطوبت، تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.
- بهتراست برای شستشو از دستگاه های اتوماتیک شستشو که قابل برنامه ریزی است استفاده نمایید. که در این صورت به دستورالعمل دستگاه شستشو مراجعه نمایید.

۷- ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترا-رنگ زا آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

۸- ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همان ترتیبی که محلول سوبسترا رنگ زا را اضافه نمودید، به همه چاهک ها اضافه کنید. سپس حداکثر ظرف مدت ۱۰ دقیقه جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول موج ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید).

## ۸. محاسبه نتایج:

۱. با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها برروی محور عمودی (محور Y) و غلظت مشخص آنها برروی محور افقی(محور X) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد را از طریق ترسیم خطوطی که از که از تمامی نقاط تلاقی عبور کرده باشد،ترسیم کنید.

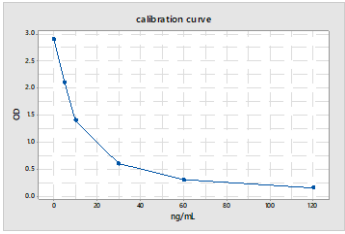
۲. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به موازات محور افقی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

۳. در صورتی از اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت که مجهز به سیستم پردازش داده های داخلی است استفاده می کنید، جهت محاسبه نتایج و ترسیم منحنی کالیبراسیون به دستوالعمل دستگاه مراجعه نمایید. برای محاسبه

نتایج کیت ۲۵-هیدروکسی ویتامینD شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس از مدل محاسباتی نقطه-به-نقطه(Point-to-point) استفاده کنید.

## داده های نمادین منحنی کالیبراسیون

مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل بعنوان داده های نمادین آورده شده است. لازم به یادآوری است این داده ها فقط جنبه راهنمایی داشته و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید براساس نتایج بدست آمده در آزمایشگاه خویش ترسیم نماید.




| Row | ng/mL | OD |
|---|---|---|
| 1 | 0 | 2.90 |
| 2 | 10 | 1.40 |
| 3 | 30 | 0.60 |
| 4 | 60 | 0.30 |
| 5 | 120 | 0.15 |

## کنترل کیفی:

در هر کیت دو نمونه کنترل وجود دارد که مقادیر موردانتظار برای هر یک برروی برچسب ویال درج شده است. علاوه بر کنترل های داخل کیت، آزمایشگاه می تواند از نمونه های سرم انباشته (Pooled serum) که در خود آزمایشگاه تهیه شده یا نمونه های کنترل خارجی نیز استفاده نماید. در دو حالت یادشده لازم به ذکر است که آزمایشگاه باید مقدار هدف و انحراف معیار نتایج و کرانه های بالا(UCL) و پایین(LCL) نمونه های کنترل را خود محاسبه و مبنای برنامه های کنترل کیفی خویش قرار دهد.

## بازه مرجع مبتنی بر سطح سلامت

در حال حاضر تعریف مطلقی برای تعیین وضعیت مطلوب ویتامین D در افراد وجود ندارد. یکی از معتبرترین معیارها برای تعیین میزان مطلوب سطح ویتامین D در فرد بر اساس میزان تأثیر مقادیر ویتامین D بر میزان هورمون پاراتیروئید و تغییر و تبدیل(Turnover) بافت استخوانی می باشد. بر طبق این معیار، سه آستانه برای سطح ویتامین D تعریف می شود :

۱. دامنه کافی(Sufficient) : در این دامنه حد سرمی ویتامینD بیشتر از ۲۹ نانوگرم در میلی لیتر می باشد که درآن مقدار هورمون پاراتیروئید در محدوده طبیعی قرار داشته و ساختار بافت استخوانی در حالت طبیعی قرار دارد. قابل ذکر است در مواردی که مقادیر سرمی ویتامین D بالاتر از ۱۰۰ نانوگرم در میلی لیتر می باشد، احتمال بروز مسمومیت در بدن وجود دارد که درآن بعلت هایپرکلیسمی رسوب کلسیم در اندام و بافت های نرم رخ می دهد.

۲. دامنه ناکافی(Insufficient) : در این دامنه حد سرمی ویتامینD در محدوده ۱۰ تا ۲۹ نانوگرم در میلی لیتر می باشد که در آن هورمون پاراتیروئید تمایل به افزایش داشته و شاهد تقویت، تغییر و تبدیل در بافت استخوانی هستیم . در این دامنه میزان تغییر چندانی در سطح سرمی املاح معدنی مشاهده نمی شود.

۳. دامنه کمبود (Deficient): در این دامنه حد سرمی ویتامینD پایین تر از ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر می باشد که در آن هورمون پاراتیروئید افزایش چشمگیر داشته و باعث بروز راشیتیسم در کودکان و استئومالاسی در بالغین می گردد .

قابل ذکر است که به دلیل تاثیر عوامل جغرافیایی، فصول سال، سن ،جنس و نژاد بر بازه سلامت ویتامین D ، هر آزمایشگاهی موظف است ابتدا انتقال پذیری(transferability) این داده ها را درخصوص جمعیت موردنظر خویش راستی آزمایی(Verification) کرده و درصورت مشاهده ناهمخوانی، بازه مرجع خود را بدست آورد.

| Vitamin D status | Reference interval |
| --- | --- |
| Deficient | <10 ng/ml |
| Insufficient | 10-۲۹ ng/ml |
| Sufficient | ۳۰-100 ng/ml |
| Potential Toxicity | >100 ng/ml |

**ضریب تبدیل واحد: 1 ng/ml = 2.5 nmol/L**

## خصوصیات اجرایی کیت

### ۱- حد پایینی اندازه گیری(Lower limit of measurement) :

حد شاهد(Limit-of-Blank:LOB) و حد آشکارسازی(Limit-of-detection: LOD)مطابق با راهنمای EP 17-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI) بدست آمد.

به طور خلاصه حد بلانک تحت عنوان مقدار صدک ۹۵ ام ($95^{th}$ percentile) از ۶۰ بار اندازه گیری برروی نمونه شاهد(استاندارد صفر) طی چندین ران بدست آمد. حد بلانک (شاهد) معادل غلظتی در نظر گرفته شد که ۹۵٪ از ۶۰ نتیجه اندازه گیری های تکراری، مقداری کمتر از آن بدست دهد. حد شاهد به روش فوق معادل ۱.۸ نانوگرم در میلی لیتر بدست آمد. برای تعیین حد آشکار سازی ۲۰ اندازه گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم(۶۰=۳×۲۰=n) با محتوای ۲۵-هیدروکسی ویتامین D کمتر از ۴ نانوگرم در میلی لیتر که مقدار آن به روش مستقل دیگری تعیین شده بود، طی سه روز انجام شد و بزرگترین انحراف معیار اندازه گیری های تکراری بر روی سه نمونه یادشده مبنای تعیین حد آشکارسازی قرار گرفت. از رابطه زیر حد آشکارسازی معادل ***۴ نانوگرم در میلی لیتر*** تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645SD_{Low}$$

### ۲- دقت(Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت ۲۵-هیدروکسی ویتامین D شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس و ۳ انباشته سرمی تهیه شده از نمونه های بیمار در نقاط مختلف بازه اندازه گیری (4-120 ng/ml) مطابق با راهنمای EP 05-A3 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI) بدست آمد.

طی ۱۰ روزکاری، سه کاربر و هر یک روزانه سه ران اندازه گیری های تکراری به صورت دوتایی در هر ران بروی نمونه های یاد شده انجام دادند (۲×۳×۳×۱۰). نتایج با روش آماری Fully nested ANOVA تحلیل گردید، که خلاصه نتایج در جدول زیر آورده شده است:

| Sample Description | Mean (ng/mL) | Repeatability | | Within-Laboratory Precision | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | SD | %CV | SD | %CV |
| Patient Pool | 9.38817 | 1.694 | 18.04 | 1.857 | 19.78 |
| Patient Pool | 32.8041 | 3.128 | 9.53 | 4.849 | 14.78 |
| patient Pool | 91.3913 | 5.098 | 5.58 | 8.939 | 9.78 |

### ۳- اختصاصیت(Specificity):

ارزیابی اختصاصیت مطابق با راهنمای EP 07-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI)، جهت تعیین واکنش متقاطع(cross reaction) کیت سنجش ۲۵-هیدروکسی ویتامین D پیشگامان سنجش ایساتیس با سایر متابولیت های ویتامین Dصورت گرفت. نمونه های حاوی واکنشگرهای متقاطع از طریق spike کردن سرم انسانی طبیعی با مواد حاوی سطوح بالایی از همان واکنشگرها به گونه ای که ماتریکس سرم بیش از ۱۰ درصد تغییر نکند،تهیه شد. سپس مقدار ۲۵-هیدروکسی ویتامین D همزمان در یک ران در نمونه هایی که با ماتریکس بی اثرspike شده بودند و نمونه هایی که با واکنشگرهای متقاطع spike شدند، اندازه گیری شد و مقدار واکنش پذیری متقاطع هر نمونه از رابطه زیر محاسبه شد و به صورت نسبت به غلظت ۲۵-هیدروکسی ویتامین D اولیه بیان شد. نتایج در جدولی که در ادامه می آید خلاصه شده است:

$$\%\text{cross} - \text{reactivity} = \frac{mean\ conc.of\ spiked\ sample - mean\ conc.of\ unspiked\ sample}{spiked\ conc.} \times 100$$

| نوع ماده | درصد تداخل(٪) |
|---|---|
| 25OH Vitamin D3 | 100 |
| 25OH Vitamin D2 | 83 |
| Vitamin D3 | <0.1 |
| Vitamin D2 | <0.1 |

### ۴- خطی بودن(Linearity):

سه نمونه مختلف سرمی در سه غلظت مختلف با استاندارد صفر به نسبت های ۱:۲، ۱:۴ و ۱:۸ رقیق شدند. سپس غلظت۲۵-هیدروکسی ویتامین D در آنها با استفاده از کیت سنجش ۲۵-هیدروکسی ویتامین D شرکت پیشگامان اندازه گیری و مقدار خطی بودن براساس نسبت مقدار مشاهده شده(Observed) به مقدار قابل انتظار (Expected) برحسب درصد محاسبه گردید($\frac{observerd}{expected} \times 100$ )که نتایج در جدول زیر خلاصه شده است(مقدار قابل قبول۲۰±۱۰۰)

| Sample NO | Primary conc. (ng/mL) | Linearity% | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1:2 | 1:4 | 1:8 |
| 1 | 34.8 | 102 | 103 | 101 |
| 2 | 54 | 107 | 104 | 103 |
| 3 | 76 | 103 | 104 | 96 |

### ۵- درستی(Trueness):

#### ۵-۱- ارزیابی بازیابی(Recovery Evaluation)

ارزیابی خطای سیستماتیک یا بایاس روش به دو صورت انجام گرفت. ابتدا میزان خطای سیستماتیک نسبی(Proportional Error) از طریق مطالعات بازیابی و با افزودن مقادیر مشخص از ۲۵-هیدروکسی ویتامین D انجام گرفت.

به طور خلاصه نمونه اولیه به دو بخش مساوی تقسیم و به یکی حجمی از سرم حاوی مقدار مشخص ۲۵-هیدروکسی ویتامین D و به دیگری همان حجم استاندارد صفر به گونه ای که ماتریکس نمونه بیش از ۱۰ درصد تغییر نکند افزوده شد. و سپس بررسی توانمندی سیستم اندازه گیری درتشخیص مقدار افزوده شده از طریق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\%Recovery = \frac{Concentration\ Recovered}{Concentration\ Added} \times 100$$

همچنین مقدار خطای سیستماتیک که به زبان ریاضی با بایاس بیان می گردد، از رابطه زیر بدست آمد:

$$\%Bias = \frac{\bar{X}\ measured - expected}{Expected} \times 100$$

نتایج این ارزیابی در جدول زیر خلاصه شده است:

| Sample | Original concentration | 10 ng/ml added | | 25 ng/ml added | | 50 ng/ml added | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Recovery% | Bias% | Recover y% | Bias% | Recovery % | Bias % |
| 1 | 34.8 ng/ml | 109 | 1.84% | 108 | 1.65% | 109 | 1.84 % |
| 2 | 54 ng/ml | 112 | 1.67% | 115 | 2.04% | 111 | 1.55 % |
| 3 | 76 ng/ml | 109 | 0.96% | 114 | 1.43% | 112 | 1.25 % |

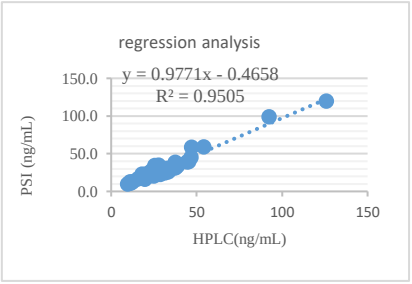
## ۲-۵- ارزیابی مقایسه ای(Method comparison)

ارزیابی مقایسه ای بین نتایج اندازه گیری کیت سنجش ۲۵-هیدرکسی ویتامین D شرکت پیشگامان و روش HPLC (n=48) انجام و مطابق با راهنمای EP 09-A2 مؤسسهٔ استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI) به روش رگرسیون خطی تحلیل گردید. در این ارزیابی نتایج کیت پیشگامان برروی محور عمودی(محور yها) و نتایج روش HPLC برروی محور افقی(محور xها) مشخص و نمودار رگرسیون خطی ترسیم گردید. خلاصه نتایج و نمودار رگرسیون خطی(Linear regression) در ادامه آورده شده است:

$$PS = 0.9771HPLC - 0.4658$$

$$r = 0.977$$

$$r^2 = 0.9505$$



## منابع و مراجع:

1. Adie Viljoen, et al, Analytical Quality Goals for 25-Vitamin D Based on Biological Variation, (2011). Journal of Clinical Laboratory Analysis 25 : 130–133
2. CLSI. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP 17-A2. Pierson-Perry J.F. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2012.
3. CLSI. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline. CLSI document EP 05-A3. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2014.
4. CLSI. Interference Testing in clinical chemistry; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP07-A23. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2005.
5. Marcus J.S. et al.(2006). Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism. 2nd ed. Elsevier Inc.
6. Norman AW (August 2008). "From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health". Am. J. Clin. Nutr. 88 (2): 491S–499S. PMID 18689389.
7. Pagana K.D. et al. (2018). Mosby’s Manual of diagnostic and Laboratory

tests.6th ed. Elsevier Inc.

8. Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics.6th ed. Elsevier Inc.
9. Royal college of pathologists of Australasia. https://www.datainnovations.com/allowable-total-error-table
10. Wolf G (June 2004). "The discovery of vitamin D: the contribution of Adolf Windaus". J. Nutr. 134 (6): 1299–302. PMID 15173387.

## خطایابی در آزمایش های الایزا

| نوع مشکل | علت مشکل | راه حل |
|---|---|---|
| پایین بودن OD استانداردها و نمونه ها | افت و یا آلودگی کونژوگه | تکرار تست با کونژوگه جدید |
| | پایین بودن دما و یا کوتاه بودن زمان انکوباسیون، به دما نرسیدن محلولهای کیت و نمونه بیماران | ۱.دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید.<br>۲.قبل از شروع آزمایش کیت و نمونه بیماران به دمای اتاق برسد. |
| | PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها | ۱.PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید.<br>۲.پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید. |
| | نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد | ۱.پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید.<br>۲.پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید. |
| | طول موج خوانش نامناسب ( ۴۵۰ nm بجای ۴۰۵nm) | ۱.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید.<br>۲.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. |
| | آلودگی استانداردها | از سری استاندارد جدید استفاده کنید. |

| | | |
|---|---|---|
| **صحیح نبودن نمودار استانداردها** | پیپتینگ نامناسب | ۱.استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف<br>۲.از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید.<br>۳.توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد.<br>۴.توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود. |
| | PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها | ۱ . PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید.<br>۲.پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید. |
| **بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD** | آلودگی استاندارد صفر | تکرار تست با استاندارد های جدید |
| | آلودگی محلول رنگزا | استفاده از محلول رنگزا جدید |
| | آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نامناسب | ۱.عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید.<br>۲. تمام سوزن های دستگاه واشر را چک کنید. |
| | طول موج نامناسب در خوانش | ۱.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید.<br>۲.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.<br>۳.از فیلتر ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید. |
| | آلودگی محلول Stop | تکرار تست با محلول Stop جدید |
| **عدم تولید رنگ در چاهک ها** | استفاده از مواد سایر کیت ها | تکرار تست با مواد همان کیت |
| | انجام نشدن مرحله ای از تست | تکرار تست |
| | آلودگی محلول رنگزا | تکرار تست با محلول رنگزا جدید |

| | | |
|---|---|---|
| | آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید | تکرار تست با محلول کونژوگه جدید |
| **عدم تکرار پذیری مناسب** | پیپتینگ نامناسب، گرفتگی لوله داخلی سمپلر بواسطه آلودگی | ۱. استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف<br>۲. از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید<br>۳. توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد.<br>۴. توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نشود.<br>۵. توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد.<br>۶. کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلر ها |
| | طولانی شدن زمان انجام تست | فاصله زمانی بین اضافه کردن استاندارد ها و نمونه نباید بیشتر از ۱۰ دقیقه باشد. در این صورت نتایج قابل اعتماد نیست. |
| | نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد | پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. |
| | باقی ماندن کونژوگه در لبه چاهکها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک ها | پیپتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید. |
| | وجود حباب در چاهک ها | در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک ها نباشد. |
| | کثیف بودن کف چاهکها | کف چاهکها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید. |
| | مخلوط نشدن محلول های کیت | قبل از استفاده، ویال محلول ها را به آرامی تکان دهید. |