IVD-REF: PS - Vit D	پیشگامان سنجش پیشگام در سنجش و خوآوری	کیت الایزا 25-هیدراکسی ویتامین دی
Ver. No: 04		Vitamin D ELISA KIT

معرف	48 تستی	96 تستی	192 تستی	آماده سازی
پلیت پوشیده شده با آنتی بادی علیه 25-هیدروکسی ویتامینD	1×48 wells	1×96 wells	2×96 wells	آماده مصرف
کالیبراتور1-6 در ماتریکس سرم حیوانی به همراه نگهدارنده(0، 5، 10، 30، 60 و 120 نانوگرم در میلی لیتر)	6 ×0.5 mL	6×0.5 mL	6 ×1.0 mL	آماده مصرف
نمونه کنترل تهیه شده در سرم حیوانی عاری از 25-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(25-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 1 به 20 با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید
محلول سوبسترا-رنگ زا(تترامتیل بنزیدین و آب اکسیژنه)	1 ×6.0 mL	1 ×12.0 mL	2 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول توقف(اسید کلریدریک 1 مولار)	1 ×6.0 mL	1 ×6.0 mL	1×12.0 mL	آماده مصرف

IVD-REF: PS - Vit D	پیشگامان سنجش پیشگام در سنجش و خوآوری	کیت الایزا 25-هیدراکسی ویتامین دی
Ver. No: 04		Vitamin D ELISA KIT

کاربرد:

کیت **25(OH) vitamin D** شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس برای اندازه گیری کمی 25-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 B(UVB) تولید می شود. در این فرآیند 7-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 10 الی 15 دقیقه و حداقل 2 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 25-هیدروکسی ویتامین D و 1و25-دی هیدروکسی ویتامین D یا کلسیتریول تبدیل می شود. 1و 25-دی هیدروکسی ویتامین D شکل فیزیولوژیک فعال ویتامین D محسوب می شود. دی هیدروکسی ویتامین D نیمه عمر کوتاهی دارد(4 تا 6 ساعت) و مقدار آن در پلاسما تقریباً یک هزارم 25-هیدروکسی ویتامین D می باشد. 25-هیدروکسی ویتامین D نیمه عمر بالایی داشته(2 تا 3 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 25-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 1-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 25-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 25-هیدروکسی ویتامین D اضافه می شود. مولکول های 25- 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 60 دقیقه انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتیگراد بدون شستشو 25-هیدروکسی ویتامین D بیوتینیله به محیط اضافه می شود. هرچه مقدار 25-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 25-هیدروکسی ویتامین D بیوتینیله فرصت اتصال به فاز جامد را پیدا می کند. 25-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 15 دقیقه رنگ آبی ظاهرمی شود. با افزودن محلول متوقف گر، واکنش آنزیمی متوقف می گردد

و در نهایت شدت جذب نوری در 450 نانومتر اندازه گیری می شود. شدت رنگ تولید شده با مقدار 25-هیدروکسی ویتامین D موجود در نمونه نسبت معکوس دارد.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

1. سمپلرهای 25، 50 و 100 میکرولیتری دقیق. سمپلر 8 کاناله با قابلیت پیپتینگ 50 تا 100 میکرولیتر و یا دیسپنسر اتوماتیک، اگرچه ضروری نیست ولی باعث بهبود قابل توجه تکرارپذیری و صحت نتایج می گردد.
2. آب مقطر با هدایت کمتر از $1\ \mu S/\ cm$
3. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر 450 نانومتری و در صورت امکان 630 نانومتری بعنوان فیلتر مرجع.
4. کاغذ رطوبت گیر
5. دستگاه واشر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر 8 کاناله یا سرنگ که قادر به ریختن 350 میکرولیتر محلول شستشو باشد.

نگهداری کیت :

1. کیت پس از تحویل باید در دمای 8-2 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.***
2. غلظت کالیبراتورها بر روی ویال درج شده است و ممکن است بین شناسه های مختلف ساخت تفاوت داشته باشد.
3. از انجماد اجزاء کیت خودداری نمایید.
4. ***محلول کاری کونژوگه تازه تهیه شده باید ظرف حداکثر 30 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.***
5. میکروپلیت باید در کیسه در بسته 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.
6. محلول شستشو باید روزانه و تازه تهیه شود و در همان روز تهیه مصرف شود.
7. تغییر در خصوصیات فیزیکی معرف ها نظیر وجود ذرات معلق در آنها اغلب حاکی از آلودگی و خرابی معرف ها می باشد

8. 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.
9. کیت های باز شده اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شوند، حداکثر به مدت 8 هفته پایدار خواهند بود.
10. 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.
11. 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:

1. سرم یا پلاسمای EDTA نمونه مناسب برای این آزمایش است.
2. از نمونه های با کدورت بالا، همولیز یا لیپمیک ترجیحاً استفاده نشود.
3. در صورتی که انجام آزمایش در همان روز جمع آوری نمونه امکان پذیر نباشد، نمونه ها را می توان برای مدت 48 ساعت در دمای 2 تا 8 درجه سانتیگراد نگه داری کرد. برای مدت طولانی تر از 48 ساعت نمونه ها دردر دمای ^{0}C 20- سانتیگراد شود.
4. 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

1. کیت فقط برای تشخیص طبی آزمایشگاهی کاربرد دارد.
2. کلیه معرف های کیت برای سنجش مستقیم 25-هیدروکسی ویتامینD سرم یا پلاسمای EDTA استانداردسازی شده اند و برای سنجش 25-هیدروکسی ویتامینD سایر مایعات بیولوژیک یا پلاسمای غیر EDTA مناسب نمی باشد.
3. 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.

4. 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 1393 مراجعه نمایید.

5. 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.

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

7. 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.

8. 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.

9. 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 1394 مراجعه نمایید.

آماده سازی معرف ها:

1. همه معرف ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (27-20درجه سانتیگراد) برسند.

2. تهیه محلول شستشو: برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با 19 حجم آب مقطر رقیق نمائید.

3. تهیه محلول کاری کونژوگه: در یک لوله تمیز و ترجیحاً یک بار مصرف ابتدا محلول رقیق کننده کونژوگه و سپس محلول کونژوگه غلیظ ×11 را با نسبت 1:11 اضافه نمایید. به عنوان مثال به 1 میلی لیتر محلول رقیق کننده کونژوگه 100 میکرولیتر کونژوگه ×11 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:

تعداد استریپ	حجم کونژوگه ×11 (میکرو لیتر)	حجم محلول رقیق کننده کونژوگه (میلی لیتر)
2	100	1
4	200	2
6	300	3
8	400	4
10	500	5
12	600	6

یادآوری 1: 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 2: 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 30 دقیقه قبل از رقیق سازی) و مخلوط کردن کامل آن صورت پذیرد.***

نکات مهم در انجام تست:

1. فرایند شستشو از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. شستشوی ناکافی باعث عدم جداشدن پیوندهای غیراختصاصی و جذب نوری زمینه (Background) می گردد.
2. کیفیت آب مقطر مصرفی در کیفیت محلول شستشو و جدا کردن پیوندهای غیراختصاصی اهمیت زیادی دارد.
3. در مواردی که مقدار 25-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.
4. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.
5. دمای مطلوب محیط آزمایشگاه برای آزمایش های الایزا 20 تا 25 درجه سانتیگراد می باشد.

6. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.
7. 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.
8. جهت پیپت کردن محلول سوبسترا-رنگ زا و محلول متوقف گر از میکروپیپت های حاوی ***قطعات فلزی استفاده نکنید***.
9. زمان انکوباسیون و دمای انکوباسیون را با دقت رعایت کنید. حداکثر دامنه قابل قبول دمای انکوباسیون37±1°C و زمان انکوباسیون 5%± می باشد.
10. 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 10 دقیقه به طول انجامد. پس توصیه می شود، در صورتی که فاقد تجهیزاتی نظیر سمپلر 8 کاناله یا دیسپنسر هستید، بیش از 5 استریپ در هر ران آزمایش نکنید.
11. در هر بار انجام آزمایش منحنی کالیبراسیون را مجدد ترسیم نموده و برای محاسبه نتایج از منحنی ذخیره شده استفاده نکنید.
12. مراحل آزمایش را بدون وقفه انجام دهید. وقفه بین مراحل باعث نتایج کاذب می گردد.
13. 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:

1- تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار را بصورت 2 تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه رطوبت گیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.

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

2- 25 میکرولیتر از استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار به داخل هر چاهک بریزید.

3- 50 میکرولیتر از محلول کاری رقیق شده کونژوگه ، به تمام چاهک ها اضافه کنید.

4- پلیت را بمدت 20 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 60 دقیقه در دمای 37±1°C انکوبه کنید.

5- پلیت را از انکوباتور خارج، برچسب پلیت را برداشته و ***بدون شستشو*** به هر چاهک 50 میکرولیتر محلول بیوتین بیافزایید و مجدداً بمدت 60 ثانیه به آرامی تکان دهید و درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و پلیت را برای مدت 30 دقیقه دیگر در دمای 37±1°C انکوبه نمایید.

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

- برای شستشوی چاهک ها، ابتدا 350 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 5 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.

7- 100 میکرولیتر از سوبسترا-رنگ زا آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را بمدت 15 دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

8- 50 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 10 دقیقه جذب نوری هر چاهک را در طول موج 450 نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول موج 630 نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید).

8. محاسبه نتایج:

1. 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.

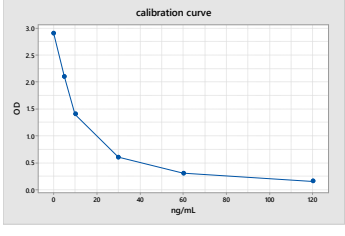
2. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به موازات محور افقی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

3. 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 25-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	5	2.10
3	10	1.40
4	30	0.60
5	60	0.30
6	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 :

1. دامنه کافی(Sufficient) : در این دامنه حد سرمی ویتامینD بیشتر از 29 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 100 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.

2. دامنه ناکافی(Insufficient) : در این دامنه حد سرمی ویتامینD در محدوده 10 تا 29 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.

3. دامنه کمبود (Deficient): در این دامنه حد سرمی ویتامینD پایین تر از 10 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	10-29 ng/ml
Sufficient	30-100 ng/ml
Potential Toxicity	>100 ng/ml

ضریب تبدیل واحد: 1 ng/ml = 2.5 nmol/L

خصوصیات اجرایی کیت

1- 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 95 ام (95^{th} percentile) از 60 بار اندازه گیری برروی نمونه شاهد(استاندارد صفر) طی چندین ران بدست آمد. حد بلانک (شاهد) معادل غلظتی در نظر گرفته شد که 95٪ از 60 نتیجه اندازه گیری های تکراری، مقداری کمتر از آن بدست دهد. حد شاهد به روش فوق معادل 1.8 نانوگرم در میلی لیتر بدست آمد. برای تعیین حد آشکار سازی 20 اندازه گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم($n=20\times3=60$) با محتوای 25-هیدروکسی ویتامین D کمتر از 4 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 ***4 نانوگرم در میلی لیتر*** تعیین گردید.

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

2- دقت(Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت 25-هیدروکسی ویتامین D شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس و 3 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 10 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 ($2\times3\times3\times10$). 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

3- اختصاصیت(Specificity):

ارزیابی اختصاصیت مطابق با راهنمای EP 07-A2 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI)، جهت تعیین واکنش متقاطع(cross reaction) کیت سنجش 25-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 10 درصد تغییر نکند،تهیه شد. سپس مقدار 25-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 25-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

4- خطی بودن(Linearity):

سه نمونه مختلف سرمی در سه غلظت مختلف با استاندارد صفر به نسبت های 1:2، 1:4 و 1:8 رقیق شدند. سپس غلظت25-هیدروکسی ویتامین D در آنها با استفاده از کیت سنجش 25-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 قبول100±20)

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

5- درستی(Trueness):

5-1- 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 25-هیدروکسی ویتامین D انجام گرفت.

به طور خلاصه نمونه اولیه به دو بخش مساوی تقسیم و به یکی حجمی از سرم حاوی مقدار مشخص 25-هیدروکسی ویتامین D و به دیگری همان حجم استاندارد صفر به گونه ای که ماتریکس نمونه بیش از 10 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 %

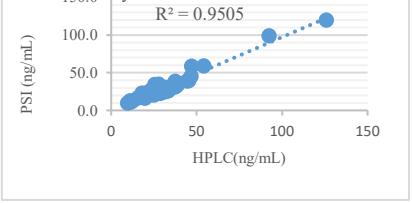
2-5- ارزیابی مقایسه ای(Method comparison)

ارزیابی مقایسه ای بین نتایج اندازه گیری کیت سنجش 25-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	1.دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید. 2.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	PH.1 آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. 2.پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	1.پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. 2.پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.
	طول موج خوانش نامناسب (405nm بجای 450nm)	1.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. 2.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید.

صحیح نبودن نمودار استانداردها	پیپتینگ نامناسب	1.استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف 2.از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید. 3.توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. 4.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	1 . PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. 2.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	1.عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. 2. تمام سوزن های دستگاه واشر را چک کنید.
	طول موج نامناسب در خوانش	1.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. 2.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. 3.از فیلتر 630 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	1. استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف 2. از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید 3. توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. 4. توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نشود. 5. توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد. 6. کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلر ها
	طولانی شدن زمان انجام تست	فاصله زمانی بین اضافه کردن استاندارد ها و نمونه نباید بیشتر از 10 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.

INTENDED USE:

25-hydroxy (25-0H) Vitamin D ELISA KIT is intended for the quantitative determination of 25-hydroxyvitamin D in human serum and plasma.

INTRODUCTION:

Vitamin D is a fat-soluble vitamin responsible for maintaining calcium and phosphorus levels in blood by promoting their absorption from food in the intestines, and by promoting reabsorption of calcium in the kidneys. This enables normal mineralization of bone, needed for bone growth and bone remodeling.

In human, two major forms of vitamin D are the vitamin D3 (cholecalciferol) and vitamin D2 (ergocalciferol). The term vitamin D also refers to "hydroxy"-metabolites of these substances. Vitamin D2 is provided by dietary sources. Because only fish is naturally rich in vitamin D, most of the Vitamin D2 intake in industrialized word is from fortified products including milk and a few other food supplements.

Vitamin D3 is produced in skin exposed to sunlight, specifically ultraviolet B(UV-B) radiation. In this scenario 7-dehyrochoesterol reacts with UVB to produce vitamin D3. Melanin functions as a light filter in the skin so individuals with dark skin and high melanin content require more time in the sunlight to produce the same amount of vitamin D as individuals with lower melanin content

Each Vitamin D produced in the skin or consumed in food, is converted to 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D in the liver and kidneys, respectively. 1,25-dihydroxyvitamin D is physiologically active form of vitamin D. Dihydroxy vitamin D has a short half-life and there are some problems with its measurement, but 25(OH) vitamin D has longer half-life and most clinicians have accepted its measurement as a good indicator of human vitamin D status.

Vitamin D deficiency can be a result of inadequate intake, inadequate sunlight exposure, malabsorption syndromes, liver or kidney disorders, or by a number of metabolic hereditary disorders. Its deficiency results in impaired bone mineralization and leads to bone softening diseases (rickets in children and osteomalcia in adults). Vitamin D deficiency may also contribute to development of osteoporosis. Vitamin D signaling to the cell is thought to involved in cell proliferation/apoptosis and cell differentiation, so decrease in serum vitamin D level may be associated with colon, breast and pancreas cancer. Vitamin D deficiency is associated with an increase in blood pressure and cardiovascular risk. It also affects the immune system through cell signaling in monocytes and activated T and B cells.

PRINICPLES OF THE METHOD:

The Pishgaman Sanjesh Isatis total 25-OH Vitamin D ELISA kit is a saturation competitive Enzyme Linked Immunosorbent assay performed on microplates coated with monoclonal antibodies against 25(OH) vitamin D. During the first 60-minutes incubation at 37°C temperature, total 25-OH Vitamin D (D2 and D3) present in samples or calibrators/controls are dissociated from binding proteins and bind to the solid phase coated antibody. At the same time, streptavidin conjugated with HRP is added to the wells. During the 2nd incubation phase, biotinylated 25(OH) vitamin D is added to the microtiter wells without washing step. The greater the amount of 25-hydroxyvitamin D in the sample, the more places of antibody were covered on the solid phase,

and the biotinylated 25-hydroxyvitamin D had lower opportunities to bind to the solid phase, so the less biotinylated 25(OH) vitamin D bound to streptavidin-HRP conjugate can bind to the solid-phase monoclonal antibody, resulting in the production of few signal. After washing, buffered Substrate/Chromogen reagent (hydrogen peroxide and tetra-methylbenzidine) is added to each well and the enzyme reaction is allowed to proceed. During the enzyme reaction, a blue color will develop and the intensity of the color is reversely proportional to the amount of 25(OH) vitamin D present in the samples.

REAGENTS PROVIDED:

Reagent	Quantity/48 Test KIT	Quantity/96 Test KIT	Quantity/192 Test KIT	Reconstitution
Microplate (96 breakable wells) coated with anti 25-OH Vitamin D	48 wells	96 wells	192 wells	Ready to Use
Calibrators 1-6 (see exact values on vial labels) in Fetal Bovine Serum with preservatives	6 Vial/0.5 ml	6 Vial/0.5 ml	6 Vial/1.0 ml	Ready to Use
2 Serum controls, in Hormone free Fetal Bovine Serum with preservatives	2 Vial/0.5 ml	2 Vial/0.5 ml	2 Vial/1.0 ml	Ready to Use
Conjugate diluent (blue color)	1 Vial/3.0 ml	1 Vial/7 ml	1 Vial/13 ml	Ready to use
enzyme Conjugate Concentrate 11X (streptavidin-horseradish peroxidase conjugate in preservatives): pale yellow color	1 Vial/0.5 mL	1 Vial/0.75 mL	1 Vial/ 1.5 mL	Dilute 11X with conjugate diluent
Biotin solution(25-OH- vitamin D conjugated to Biotin in preservative): Deep yellow color	1 Vial/3.0 ml	1 Vial/7 ml	1 Vial/13 ml	Ready to Use
Concentrated Wash solution	1 Vial/30ml	1 Vial/30 ml	1 Vial/50 ml	Dilute 1:20 with distilled water
Substrate-Chromogenic solution (Tetra-methylbenzidine and hydrogen peroxide)	1 Vial/6.0ml	1 Vial/12ml	2 Vial/12 ml	Ready to Use
Stop solution (H2So4 0.12M) Additional information about other additive is considered proprietary.	1 Vial/6.0 ml	1 Vial/6.0 ml	1 Vial/12.0 ml	Ready to Use

Materials required but not supplied with kit

The following materials are required but not provided in the kit:

- Distilled water with conductivity < 1µS/cm
- Precision micropipettes for delivery of 25, 50, 100 microliters. An 8-channel pipette or respenser pipette with disposable plastic tips for delivery of 50-100 µL is useful but not essential. Pipettes for dispensing milliliter volumes.
- Vortex mixer
- Automatic washer or any other device which can deliver 350 microliter wash solution for microplates
- Microplate reader with a wavelength of 620-650 nm and 450 nm, and an absorbance range of 0-3

STORAGE AND EXPIRATION DATE OF REAGENTS

- If kept at 2-8 °C, before opening or reconstitution, all kit components are stable until the expiry date as it is indicated on their label.
- **Freshly prepared Working conjugate solution should be used within 30 minutes after preparation. Do not prepare more working conjugate solution than the amount which will be used within this period and unused remaining solution must be discarded.**
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the preparation day.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration. Chromogenic solution TMB should be colorless. Blue color indicates that the reagent has been contaminated and should be discarded.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Human serum and EDTA plasma are samples of choice for PSI 25(OH) vitamin D kit.
- If the measurement cannot be done within 24 hours after sample collection, samples should be kept at 2-8 °C up to 48 hours. For longer storage serum or plasma must be stored at -20°C.
- Avoid repeated freeze and thaw cycles. Frozen specimens must be gently but thoroughly mixed after thawing.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

- For Professional in vitro diagnostic use only
- Please refer to the U.S. Department of Health and Human Services (Bethesda, Md., USA) publication No (CDC) 88—8_95 on laboratory safety procedures or any other local or national regulation.
- Handle all patient specimens as potentially infectious.
- Reagents contain sodium azide (NaN3) as a preservative. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. Follow local guidelines for disposal of all waste material.
- All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal products should be treated as potentially infectious.
- Avoid any skin contact with all reagents, stop solution contains strong acid. In case of contact, wash thoroughly with soap and water.

Caution

Materials used in the preparation of human source reagents have been tested and found to be non-reactive for HIV 1 & 2 antibodies, HCV antibody and hepatitis B Surface Antigen (HBsAg). Since no method can completely rule out the presence of blood borne diseases, the handling and disposal of human source reagents from this product should be made as if they were potentially infectious.

Preparation of reagents:

Wash Buffer:

According to volume required, pour the desired volume of wash concentrate into a clean container and dilute 20 fold by adding adequate volume of distilled or deionized water to gain a buffered

Wash Solution. E.g. 10 mL wash concentrate to 190 mL distilled water. Wash solution should be prepared daily and discard unused working wash solution at the end of the day.

Working Conjugate solution:

Prepare the required quantity of working conjugate solution by adding 100 µL of Enzyme Conjugate Concentrate 11X to 1 mL of conjugate diluent. Mix gently but thoroughly. Working conjugate solution must be used within 30 minutes after preparation. Following table can be used as a guide to prepare the working conjugate solution:

Conjugate diluent (mL)	Concentrated conj.(11X) (µL)	No of strips
1	100	2
2	200	4
3	300	6
4	400	8
5	500	10
6	600	12

Caution: Conjugate diluent contains some ingredients that may precipitate in cold, so it is strongly recommended that you ***bring conjugate diluent to the room temperature, before preparing the working conjugate solution***.

Note: Working conjugate solution is highly sensitive to metal ions, ***so it is strongly recommended to use disposable plastic tubes to prepare the working conjugate solution.***

HANDELING NOTES:

- Do not use the kit or components beyond expiry date.
- Do not mix up vial caps.
- Do not mix reagents from different kit lots.
- Bring all the reagents to the room temperature prior to use. Conjugate diluent contains some ingredients that may precipitate in cold, so it is strongly recommended that you ***bring conjugate diluent to the room temperature, before preparing the working conjugate solution***.
- Thoroughly mix all reagents, calibrators/controls and samples by gentle agitation or swirling.
- Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
- Use a clean container and high-quality distilled or deionized water to prepare the Working Wash solution.
- In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for addition of each reagent and sample.
- For dispensing of the Chromogenic solution and Stop solution avoid pipettes with metal parts.
- High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
- Adhere the incubation times carefully. Tolerance limit of incubation time is ±5%.

- To avoid drift, the time between pipetting of the first calibrator and the last sample must not be more than 10 minutes (Time delay). It is strongly recommended not to run more than 5 strips when pipetting manually.
- Perform all steps consecutively without any delay. Any delay in each step has deleterious effects on the final results.
- Draw a calibration curve for each run, do not use stored curve from previous runs.
- Incubation with Chromogenic solution, must be done in the dark.
- Opened reagents are stable maximally for 8 weeks if they are not contaminated, stored in resealed original containers, and handled as prescribed. Return to 2-8°C immediately after use

Measurement Procedure:

1. Transfer the required number of microplate strips to a strip frame. (Immediately return the remaining strips to the aluminum pouch containing a desiccant, reseal carefully and store at 2-8°C.
2. Pipette 25 µL of each Calibrator (calibrators 0, 5, 10, 30, 60, 120 ng/mL), controls and patient samples in duplicate into the appropriate wells.
3. Pipette 50 µL of working conjugate solution into each well. Avoid carry-over by holding the pipette tip slightly above the top of the well and avoid touching the plastic strip or surface of the liquid.
4. Gently mix for 15 seconds
5. Cover the plate with an adhesive seal and incubate for 60-minutes at 37°C.
6. After 1st incubation, add 50 µL biotin solution to each well ***without washing***.
7. Gently mix for 15 seconds.
8. Cover the plate with an adhesive seal and incubate it for 30 minutes at 37°C ± 1°C.
9. Wash the plate according to the procedure below.
   i. Carefully dispense 350 µL of working wash solution into each well.
   ii. Aspirate the content of each well.
   iii. Repeat four additional wash for a total of 5 wash cycles.
   iv. At the end of the last wash cycle, invert the plate and tap it carefully against an absorbent paper.

Note: *Automatic strip washer: Follow the manufacturer's instructions for maintenance* and *wash the required number of wash cycles after second incubation step.*

10. Add 100 µL of Chromogenic solution TMB to each well using the same pipetting technique as in item 3. The Chromogenic solution TMB should be added to the wells as quickly as possible and the time between addition to the first and last well should not exceed 5 min.
11. Incubate for15 min at room temperature preferably in the dark. Avoid exposure to direct sunlight.
12. Add 50 µL of Stop Solution, mix and read the absorbance at 450 nm in a microplate spectrophotometer within 10 min after addition of Stop Solution.

Important Note: *always add stop solution in the same order as chromogenic solution TMB.*

CALCULATION OF RESULTS

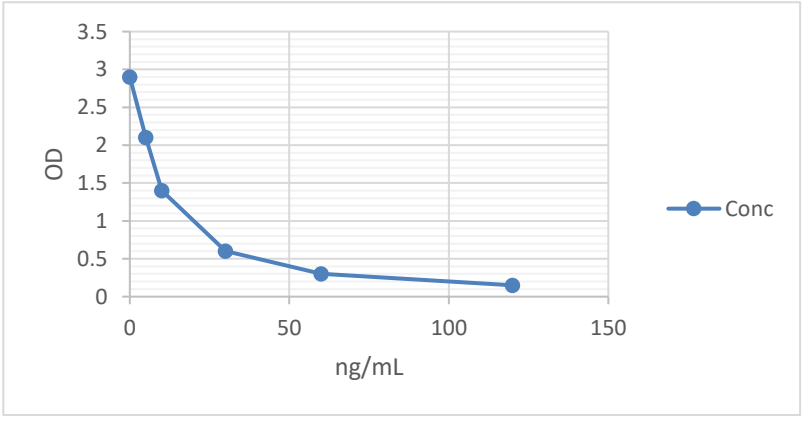
1. Construct a calibration curve by plotting the average O.D. (450 nm) for each calibrator on the vertical (Y) axis against the concentration on the horizontal (X) axis, and draw a best fit curve through the points on the graph.
2. To determine concentration of 25(OH) Vit D in each sample, first locate the O.D. value on the Y-axis and extend a horizontal line to the calibration curve. At the point of intersection, draw a vertical line to the X-axis and read the corresponding concentration.
3. If a microplate spectrophotometer with built-in data calculation program is used, refer to the manual of the spectrophotometer and create a program using the concentration stated on the label of each Calibrators. For automatic calculation of 25(OH) vitamin D results, it is recommended to use point-to-point method.

Typical Data:

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real-time calibration curve.

Total 25-OH Vitamin D		OD Units
Calibrator	0.0 ng/ml	**2.9**
	5.0 ng/ml	**2.1**
	10.0 ng/ml	**1.4**
	30.0 ng/ml	**0.6**
	60.0 ng/ml	**0.3**
	120.0 ng/ml	**0.15**

Note: 1 ng/ml=2.5 pmol/L



Quality control:

25(OH) vitamin D low and high control serums should be used for validation of the assay series. Ranges of expected results are indicated on the vial labels. If assigned range is not obtained, a complete check of reagents and reader performance should be made and the assay shall be repeated. Each laboratory can also prepare its own serum pools at different levels, which can be used as internal controls in order to ensure the precision of the assay

Health based reference values

Currently there is no absolute definition of the optimal vitamin D status. It should be taken into account that differences in 25(OH) D levels may exist with respect to gender, age, season, geographical latitude and ethnic groups.

Each laboratory should first investigate the transferability of the recommended expected value to its own patient population and if it doesn't match, determine its own reference interval. Population based reference interval should not be taken as clinical guide to recommend vitamin D supplementation. The values given here is based on the published data, gathered from healthy population from IR Iran-Tehran and must be considered as information only.

LEVEL	REFERENCE VALUE
DEFICIENT	<10 ng/ml
INSUFFICIENT	10-30 ng/ml
SUFFICIENT	31-100 ng/ml
TOXICITY	>100 ng/ml

PERFORMANCE CRITERIA:

1. Lower limit of measurement:

The Limit of Blank and Limit of Detection were determined according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A2 guideline.

In brief, Limit of Blank was determined as the 95th percentile value from n = 60 measurements on standard 0 over several runs. The Limit of Blank equals to the concentration that 95% of repeated measurements on zero standard give value below it. In the next step we determined standard deviation of repeated measurements on 3 samples with Vitamin D contents less than 4 ng/mL determined from a separate method study (HPLC Method). By adding the LOB calculated at 1st step to 1.645 times the greatest standards deviation calculated in the 2nd step($LOD = LOB + 1.645SD_L$) LOD calculated as 4.0 ng/mL.

2. Precision:

Precision was determined using PSI 25(OH) Vitamin D reagents and 3 pooled human sera ranging in different points of measuring range (4-120 ng/mL) according to EP05-A3 Guideline.

In brief, 2 human pooled serum prepared without any modification and another one prepared by

spiking an extra human serum pooled. 3 runs per day (morning, midday and afternoon) by 3 user in 10 working days(10 × 3 × 3). Results analyzed by fully nested ANOVA using a spreadsheet. The results are summarized in table below:

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
Spiked patient Pool	91.3913	5.098	5.58	8.939	9.78

3. Specificity:

Specificity evaluation was performed according to guideline CLSI EP07-A2 to assess the cross-reactivity of the assay with other vitamin D metabolites. Samples containing cross-reactants were prepared by spiking natural human sera with material containing high levels of cross-reactants. Modification of serum matrix was no more than 10%. The % cross-reactivity was calculated for each sample using the equation below and normalized to the 25(OH) vitamin D3:

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

The results are summarized in the following table:

Compound	% Cross reaction
25OH Vitamin D3	**100**
25OH Vitamin D2	**83**
Vitamin D3	**<0.1**
Vitamin D2	**<0.1**

No interference, from common serum abnormalities, were seen up to following listed concentration:

Interferent	source	Final concentration of interferent in test serum
Hemoglobin	**Fresh haemolysed blood**	**50 mg/mL**
Conjugated Bilirubin	**Commercially crystalline Unconjugated Bilirubin**	**20 mg/dL**
Triglycerides	**Commercially Intralipid 10%**	**1000 mg/dL**

4. Trueness:

4.1 Recovery Evaluation

Recovery was assessed by adding different levels of 25-OH vitamin D to 3 different samples in 3 points of measuring range. The percentage recovery and % bias was calculated for each sample using the equations below:

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

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

The results are summarized in the following table:

Sample	Original concentration	10 ng/ml added		25 ng/ml added		50 ng/ml added	
		Recovery%	Bias%	Recovery %	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%

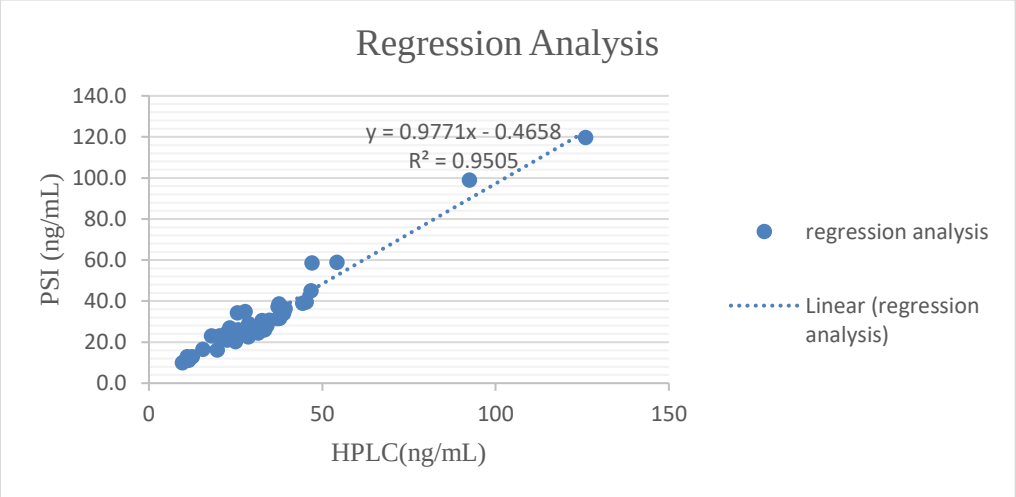
4.2 Method comparison:

A comparison of PSI 25(OH) vitamin D assay (y axis) using 48 patient samples with concentrations assigned by the HPLC Vitamin D assay (X axis) gave the following correlations:

$$Y = 0.9771x - 0.4658$$

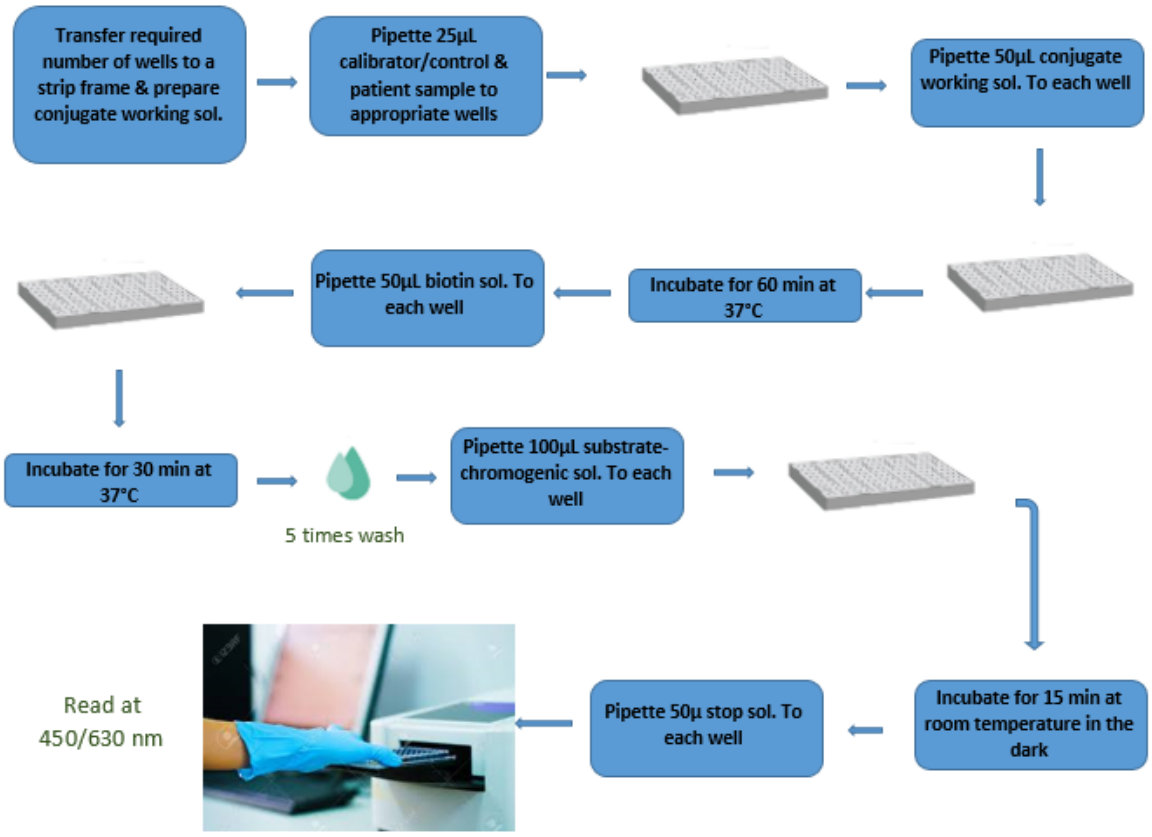
$$r = 0.977$$

$$r^2 = 0.9505$$



REFERENCES:

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



SUMMARY OF THE PROTOCOL