

## НАБОР ИФА

# ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ 25-ГИДРОКСИВИТАМИНА D И ДРУГИХ ГИДРОКСИЛИРОВАННЫХ МЕТАБОЛИТОВ В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ

### AC-57F1, AC-57F2, 25-OH Vitamin D EIA

Каталог. № : AC-57F1, AC-57F2      Методика от 29-06-2012  
Количество : 96      Версия 10  
Производитель: IDS  
(Великобритания)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

#### Для использования в in-Vitro диагностике

#### ВВЕДЕНИЕ

Набор IDS OSTEIA 25-Hydroxy Vitamin D предназначен для количественного определения 25-гидроксивитамина D (25-OH Vit D) и других гидроксированных метаболитов в сыворотке и плазме. Результаты необходимо использовать в совокупности с другими клиническими и лабораторными данными для оценки обеспеченности организма витамином D.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Витамин D – обычно используемый собирательный термин для группы близких по структуре родственных секо-стероидов. Он участвует в качественной абсорбции кальция и регуляции гомеостаза кальция. Известны 2 различные формы витамина D - D3 и D2 (эргокальциферол), которые имеют очень близкое строение. Последний представляет собой синтетический продукт, который преимущественно абсорбируется из обогащенных пищевых продуктов. Физиологический уровень витамина D3 зависит от его поступления с пищей, а также от процессов его биосинтеза в коже из 7-дегидрохолестерола в глубоко расположенных и активно растущих слоях эпидермиса под влиянием ультрафиолета солнечных лучей: 7-дегидрохолестерол подвергается фотолитическому расщеплению кольца «В» до пре-витамина D3 (холекальциферол), который изомеризуется в витамин D3. Витамин D2 метаболизируется в витамин D3 подобным же образом.

Витамин D депонируется в адипоцитах и поступает в циркуляцию в связанном со специфическим белком (VDBP – витамин D связывающий белок) и альбумином виде. В печени витамин D далее гидроксилируется с образованием 25-гидроксивитамина '44 (25-OH Vit D), являющегося главным циркулирующим метаболитом витамина D тоже в комплексе с VDBP. Небольшая часть 25-OH Vit D в дальнейшем гидроксилируется в почках под контролем паратгормона и уровня ионизированного кальция до биологически активной формы 1,25-дигидроксивитамина D (1,25(OH)2 Vit D).

Дальнейшее гидроксирование и метаболические превращения витамина D приводят к образованию водорастворимых соединений, которые легко экскретируются. Печёночная активность витамин D 25-гидроксилазы не является жёстко регулируемой, поэтому изменения в продукции витамина D3 в коже или в поступлении его с пищей могут приводить к изменениям в уровне циркулирующего 25-OH Vit D(1).

Концентрация витамина 25-OH Vit D в сыворотке считается самым надёжным показателем полного витамин D-зависимого статуса, поэтому она может быть использована для определения обеспеченности организма витамином D(2). Определение витамин D-зависимого статуса может быть необходимым для выяснения причин патологической концентрации сывороточного кальция у пациентов.

Концентрация 25-OH Vit D снижается с возрастом, у лиц пожилого возраста обычно наблюдается дефицит витамина D.

Клинически определение 25-OH Vit D используется для диагностики и контроля лечения постменопаузального остеопороза, рахита, остеомаляции, почечной остео дистрофии, беременности, неонатальной гипокальциемии и гипопаратиреоза. Также в последнее время обсуждается проблема субклинического дефицита витамина D в

различных Европейских странах. Интоксикация витамином D наблюдается в основном при передозировке его фармакологических препаратов и может приводить к гиперкальциемии, гиперкальциурии и нефрокальцинозу у предрасположенных детей.

#### ПРИНЦИП МЕТОДА

IDS OSTEIA 25-Hydroxy Vitamin D тест основан на методе иммуноферментного анализа, в котором количественно определяются 25-OH Vit D и другие гидроксированные метаболиты в сыворотке и плазме. Калибраторы, контроли и образцы разводятся биотинилированным 25-OH Vit D. В ходе реакции 25-OH Vit D калибраторов, контролей и образцов конкурирует с биотинилированным 25-OH Vit D за места связывания u1085 на высоко специфичных овечьих анти- 25-OH Vit D антителах, сорбированных в лунках планшета в течение 2-х часов при комнатной температуре. После аспирации реагента и промывки в планшет добавляется пероксидаза хрена, конъюгированная с авидином, формируется комплекс, количественно определяемый далее в ходе инкубации с субстратом ТМБ. Интенсивность развившейся окраски обратно пропорциональна содержанию 25-OH Vit D в стандарте/образце/контроле. По результатам измерения контролей строится калибровочная кривая, концентрация 25-OH Vit D в образцах определяется с использованием данной кривой.

#### ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Только для диагностики *in vitro*

Не использовать внутрь для человека и животных.

Строго следовать настоящей инструкции. Если результаты получены при несоблюдении инструкции, IDS Limited не отвечает за любые повреждения набора, за исключением случаев, предусмотренных уставом.

**ОСТОРОЖНО:** Компоненты набора содержат материалы человеческого и животного происхождения, с которыми следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными. При хранении, использовании и утилизации реагентов, входящих в состав набора, необходимо руководствоваться правилами хорошей лабораторной практики и общепринятыми положениями.

#### Человеческая сыворотка

Калибраторы и контроли протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие HbsAg гепатита В, антител к гепатиту С и ВИЧ 1 и 2. Однако, ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными, и в работе придерживаться региональных нормативных документов по работе с инфекционным биологическим материалом.

#### Азид натрия

В качестве консерванта некоторые реагенты содержат азид натрия, который может реагировать со свинцом, медью или латуной и образовывать взрывчатые азиды металлов. Смывайте отходы большим количеством воды для предотвращения образования азидов металлов.

#### 0,5M соляная кислота

Стоп-раствор содержит 0,5 М соляную кислоту.

R36/38 Вызывает раздражение глаз и кожи.

S26 При попадании стоп-раствора на кожу промойте место контакта большим количеством воды и обратитесь к врачу.

S36/37 Используйте защитные перчатки и защитную одежду при работе.

#### Тетраметилбензидин

Субстрат ТМБ содержит 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

R21/22 Опасен при попадании на кожу и при проглатывании.

S36/37 Используйте защитные перчатки и защитную одежду при работе.

#### ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

##### 25-D биотиновый конъюгат

Поставляется в виде лиофилизированного концентрата.

Добавьте 3 мл Буферного раствора во флакон с концентратом (получается голубой раствор), закройте крышкой и оставьте на 10-15 минут при комнатной температуре, затем переверните несколько раз для полного растворения. Добавьте растворенный концентрат Биотинового конъюгата (3 мл) во флакон с остатками Буферного раствора. Хорошо перемешайте перемешиванием. Готовый раствор

(50 мл) 25-D Биотинового конъюгата имеет зелёный цвет. Промаркируйте флакон «25-D биотиновый конъюгат». Храните при температуре 2-8 °C в темноте.

#### Промывочный раствор

Разбавьте концентрат промывочного раствора до объема 1000 мл (добавьте 50 мл концентрата к 950 мл дистиллированной или деионизированной воды), тщательно перемешайте. Хранить при комнатной температуре.

Все другие реагенты готовы к использованию. Позвольте всем реагентам достичь комнатной температуры перед использованием. Перемешайте тщательно реагенты переворачиванием перед использованием.

#### СРОК ГОДНОСТИ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Набор стабилен до указанного срока годности при условии хранения при 2-8 °C.

Реконституированный 25-D Биотиновый конъюгат может храниться при 2-8 °C до 8 недель в темноте.

Не использованные стрипы необходимо вернуть в пакет с осушителем и плотно закрыть по краю липкой лентой. Храните при 2-8 °C в течение 8 недель.

Контроли могут храниться при 2-8 °C в течение 8 недель.

Промывочный раствор может храниться при комнатной температуре до 8 недель.

#### Показатели разрушения реагентов

- Присутствие посторонних частиц в любом из реагентов
- Снижение оптической плотности нулевого калибратора
- Сдвиг наклона кривой по сравнению с нормальной позицией

#### СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Для анализа пригодны сыворотка или плазма (ЭДТА- и гепариновая). Образцы необходимо отделить от эритроцитов как можно быстрее после забора крови. Для длительного хранения используйте температуру -20 °C. Избегайте повторных циклов замораживания/оттаивания образцов.

#### АВТОМАТИЗИРОВАННЫЕ ПЛОЩАДКИ

Пользователи должны учесть, что данный набор был разработан для проведения анализа вручную, используя нижеописанную процедуру. Протокол не обязательно подходит для автоматизированного метода. Для проведения анализа в автоматизированном режиме, пользователям, вероятно, будет необходимо оптимизировать протокол проведения процедуры, который может значительно отличаться от описанного ниже. Консультации можно получить в службе поддержки.

#### ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

##### Реагенты, входящие в состав набора

##### 1. Калибраторы № 0-6

Содержат лиофилизированные стандарты 25-OH Vit D и 0,09% азид натрия. Концентрации стандартов указаны на флаконах, объем 1 мл/флакон, 7 флаконов в наборе.

##### 2. Микропланшет с сорбированными лунками

Микропланшет с полистереновыми ячейками, сорбированными поликлональными овечьими анти-25-OH Vit D антителами, планшет на 96 лунок (12 стрипов по 8 лунок) в запечатанном пакете с осушителем.

##### 3. Концентрат (50x) 25-D Биотинового конъюгата

Лиофилизированный буферный раствор, содержит 25-гидроксивитамин D, меченый биотином, содержит патентованные стабилизаторы, 1 мл во флаконе

##### 4. Буферный раствор

Патентованный реагент для диссоциации 25-OH Vit D из комплексов со связывающими его белками, 50 мл во флаконе.

##### 5. Ферментный конъюгат

Фосфатно-солевой буфер, содержащий авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена, белок, ферментные стабилизаторы и консерванты, 22 мл во флаконе.

##### 6. Контроли 1-2

Лиофилизированная человеческая сыворотка, содержит 25-гидроксивитамин D, 0,09% азида натрия, 1 мл во флаконе, 2 флакона в наборе.

##### 7. ТМБ субстрат

Патентованная водная форма тетраметилбензидина (ТМБ) и перекиси водорода, 28 мл во флаконе.

##### 8. Стоп-раствор

0,5 М соляная кислота, 13 мл во флаконе.

##### 9. Промывочный буферный раствор, концентрат (20x)

Фосфатно-солевой буфер, содержащий Tween, 50 мл во флаконе.

##### 10. Пленка для заклеивания планшета - 8 штук.

##### 11. Документация: Инструкция и Сертификат QC.

#### НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Полипропиленовые или боросиликатные стеклянные пробирки однократного применения 12x75мм.  
*Замечание: полистироновые пробирки непригодны. Не используйте пробирки повторно.*
2. Пипетки переменного объема на 25 и 200 мкл.
3. Диспенсер на объем 1 мл.
4. Многоканальные пипетки на 100 и 200 мкл.
5. Миксер типа Вортекс.
6. Автоматическое промывающее устройство (опция).
7. Микропланшетный ридер с программным обеспечением для обработки результатов.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Приготовьте реагенты, как это описано в разделе «Приготовление реагентов»

1. Приготовьте маркированные пробирки из боросиликатного стекла или полипропилена для каждого Калибратора, Контроля и образца.
2. Внесите по **25 мкл** каждого Калибратора, контроля или образца в маркированные пробирки.
3. Добавьте по **1 мл** 25-D биотинового раствора во все пробирки. Перемешайте в течение 10 секунд.
4. Добавьте **200 мкл** каждого разбавленного Калибратора, Контроля или образца в соответствующие ячейки сорбированного планшета в дублях. Закройте планшет крышкой и поместите планшет в пластиковый пакет. Инкубируйте 2 часа при 18-25 °C.
5. Промойте ячейки 3 раза Промывочным раствором:
  - a) Для автоматического режима промывки: 300 мкл раствора на ячейку на 3 цикла промывки, полностью удаляя жидкость после каждой промывки.
  - b) Ручная промывка: Удалите содержимое ячеек переворачиванием. Добавьте 250 мкл Промывочного раствора во все ячейки. Удалите жидкость и повторите цикл добавления-удаления Промывочного раствора еще дважды.

Просушите ячейки переворачиванием на фильтровальную бумагу или другой абсорбент для удаления остатков промывочного раствора. Переходите к следующему шагу.

6. Добавьте **200 мкл** Ферментного конъюгата во все ячейки с использованием многоканального дозатора. Закройте планшет крышкой и поместите в пакет. Инкубируйте 30 минут при 18-25 °C.  
*Замечание: ТМБ Субстрат легко загрязняется. Забирайте из флакона только необходимое количество реагента. Выбросьте остаток от этой порции неиспользованного Субстрата. Не сливайте его обратно во флакон.*
7. Повторите шаг 5.
8. Добавьте **200 мкл** ТМБ Субстрата во все ячейки с использованием многоканального дозатора. Закройте крышкой планшет и поместите его в пластиковый пакет. Инкубируйте 30 минут при 18-25 °C.  
*Замечание: ТМБ Субстрат легко загрязняется. Забирайте из флакона только необходимое количество реагента. Выбросьте остаток от этой порции неиспользованного Субстрата. Не сливайте его обратно во флакон.*
9. Добавьте **100 мкл** Стоп-раствора (соляной кислоты) во все ячейки с использованием многоканального дозатора.
10. Определите оптическую плотность ячеек при 450 нм с фильтром сравнения 650 нм в течение 30 минут после добавления стоп-реагента.

#### Подсчет результатов

Для построения калибровочной кривой и расчета результатов концентраций неизвестных образцов или контролей могут быть использованы различные программы. Рекомендуется использовать 4-хпараметровую логистическую кривую, не включающую Калибратор 0. Альтернативно используется сглаженный сплайн. Другие алгоритмы не рекомендуются.

Также калибровочная кривая может быть построена с использованием миллиметровой бумаги. На оси Ординат откладывается Средняя плотность, а на оси абсцисс – концентрация. Не рекомендуется включать Калибратор 0 в калибровочную кривую.

Считать среднюю плотность каждого не известного образца с калибровочной кривой в нмоль/л.

Перевод единиц измерения:

$$X \text{ nmol/L} \times 0.40 \Rightarrow Y \text{ ng/mL}$$

$$\Leftarrow \times 2.5$$

### Пример данных анализа

Данные приведены в примере только для иллюстрации и **не должны** использоваться для расчёта результатов образцов.

№ ячейки	Образец	Опт. плотность (ОП)	Среднее ОП	В/Во%	Значение (нМЕ/мл)
A1, A1	Калибратор 0 0 нмоль/л	2.476	2.503		
		2.530			
B1, B2	Калибратор 1 6,8 нмоль/л	2.313	2.301	91.9	
		2.288			
C1, C2	Калибратор 2 14 нмоль/л	1.912	1.910	76.3	
		1.908			
D1, D2	Контроль 3 27 нмоль/л	1.495	1.497	59.8	
		1.499			
E1, E2	Контроль 4 67 нмоль/л	0.919	0.912	36.4	
		0.905			
F1, F2	Калибратор 5 179 нмоль/л	0.521	0.522	20.8	
		0.522			
G1, G2	Калибратор 6 380 нмоль/л	0.372	0.370	14.8	
		0.368			
H1, H2	Образец пациента 1	1.237	1.247	49.8	39
		1.257			
A3, A4	Образец пациента 2	0.951	0.960	38.4	62
		0.969			
B3, B4	Образец пациента 3	0.591	0.602	24.0	138
		0.612			

### Типичная калибровочная кривая

Эта калибровочная кривая только для иллюстрации. (См. оригинал инструкции).

### КАЛИБРОВКА

Калибраторы витамина 25-ОН D стандартизированы по количеству U.V.

### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Два набора контролей поставляются для тестирования в качестве неизвестных образцов. Они предназначены пользователю как помощь в оценке, изо дня в день, в достоверности полученных результатов. Сертификат Контроля качества, который входит в каждый набор, содержит информацию о **средней концентрации** каждого контроля, полученную IDS при тестировании большого количества образцов, и **диапазоне**, который является эквивалентом  $\pm 20\%$  от средней концентрации. IDS рекомендует пользователю сохранять графические результаты полученных значений контролей, а также подсчитанные значения: Среднее, SD и %CV. Это позволит пользователю следить за работой контролей, как уже использованных, так и используемых в настоящее время, а также сравнить их с данными Контроля качества, которые поставляются, для выявления контрольных значений, которые значительно отличаются от нормального диапазона.

При интерпретации контрольных данных пользователь должен обратить внимание на следующие пункты:

- Данный продукт был разработан как продукт для ручного анализа. Указанный диапазон действителен только для анализов, проведенных вручную, и при строгом соблюдении инструкции по проведению анализа, описанной выше. **Тем не менее, специалистами по Контролю Качества установлено, что как результат в разнице условий и лабораторий, всегда будет присутствовать непостоянство в средних значениях и точности контрольных измерений между различными лабораториями.** Диапазон, указанный в QC, не всегда может совпадать с полученными значениями. Поэтому, каждой лаборатории необходимо установить свой собственный диапазон контрольных значений. Это предостережение касается тех пользователей, кто проводит данный анализ на автоматических системах, и тех, кто не соблюдает установленной процедуры проведения анализа.
- Пользователи, которые не способны установить свой собственный контрольный диапазон, или те, которые используют диапазон, данный в Сертификате QC, не должны автоматически проваливать тест, если контрольные значения выходят за пределы установленного диапазона.

### ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- Набор предназначен для использования с образцами человеческой сыворотки и плазмы, полученными с использованием стандартных методов. Набор не предназначен для работы с образцами, которые были видоизменены каким-либо образом.
- Образцы с предполагаемой концентрацией выше наивысшего калибратора, должны быть разбавлены перед анализом. Рекомендуется разведение 1:4: 1 часть образца + 3 части разбавителя. Полученная концентрация образца может быть рассчитана по следующей формуле:

$$A = (4M) - (3D),$$

Где A = актуальная концентрация

M = измеренная концентрация

D = концентрация разбавителя

Например:

Измеренная концентрация = 60

Концентрация разбавителя = 10

Полученная концентрация =  $(4 \times 60) - (3 \times 10) = 240 - 30 = 210$

- Как в случае любых диагностических процедур, никакой отдельный результат не должен использоваться для целей конечной диагностики. Должны приниматься во внимание все клинические и лабораторные данные и другая информация, доступная врачу.
- Рабочие характеристики данного анализа не были установлены для детского населения.
- В редких случаях, из-за экстремально высоких титров антител к авидину, может наблюдаться интерференция.
- Следующие соединения были проверены, и найдено, что они не интерферируют с методом IDS 25-Hydroxy Vitamin D в следующих количествах:  
Гемоглобин – проверена концентрация до 1470 мг/дл  
Билирубин - проверена концентрация до 513 мкмоль/л  
Липиды – проверена концентрация до 5,6 ммоль/л триглицеридов

### ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Каждой лаборатории следует определить свой собственный диапазон ожидаемых значений для тестируемой популяции.

На основе доступной литературы были составлены следующие рекомендации относительно уровней 25-ОН D:

Уровень	Диапазон	
	нмоль/л	нг/мл
Недостаточный	< 25	< 10
Неудовлетворительный	25-74	10-29
Удовлетворительный	75-250	30-100
Потенциальная Интоксикация	> 250	> 100

Следующий диапазон был определен с использованием *IDS набора 25-Hydroxy Vitamin D* и рекомендован в качестве ориентировочного:

Здоровые взрослые 47,7 – 144 нмоль/л (n = 36)

### ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

#### Точность

Набор IDS 25-Hydroxy Vitamin D был сравнен с радиоиммунным методом количественного определения 25-гидроксивитамина D и других гидроксированных метаболитов. 180 образцов, отобранных для определения 25-гидроксивитамина D [9,3–151,2 нмоль/л], были проанализированы этими двумя методами. Было выполнено сравнение данных методом квадратичного регрессионного анализа, и получена следующая корреляция:  
IDS = 1,01 (x) + 0,7; коэффициент корреляции (r) = 0,9

#### Чувствительность анализа

Предел чувствительности метода определения концентрации 25-ОН Vit D представляет собой среднюю концентрацию 10 реплик нулевого калибратора минус 2 стандартных отклонения. Чувствительность данного анализа составляет 5 нмоль/л.

#### Точность

Внутри серии значение (нмоль/л)	n=10 %CV	Между сериями значение (нмоль/л)	n=11 %CV
39.0	5.3	40.3	4.6
67.1	5.6	72.0	6.4
165	6.7	132	8.7

### Извлечение

Извлечение было определено добавлением 25-ОН D в образцы до анализа:

Образец	Измеренное значение (нмоль/л)	Ожидаемое значение (нмоль/л)	Извлечение, %
A	122	126	97
A	95,6	98,4	97
B	147	141	104
B	123	118	105
		Среднее	101

### Линейность

Линейность была определена разбавлением образцов буфером (ФСБ, содержащий 9% БСА) и последующим анализом разбавленных образцов данным методом.

Образец	Измеренное значение (нмоль/л)	Ожидаемое значение (нмоль/л)	% Измеренное/Ожидаемое
A	83,9		
A/2	41,0	42,0	98
A/4	20,8	21,0	99
A/8	13,1	10,5	125
B	83,9		
B/2	43,5	42,0	104
B/4	23,1	21,0	110
B/8	10,7	10,5	102
C	104		
C/2	45,9	52,0	88
C/4	22,5	26,0	87
C/8	14,1	13,0	108
		Среднее	102

### Специфичность

Специфичность антисыворотки определялась с добавлением в образец следующих веществ по 50% связыванию нулевого калибратора.

Аналит	Кросс-реактивность
25-гидроксивитамин D <sub>3</sub>	100%
25-гидроксивитамин D <sub>2</sub>	75%
24,25-дигидроксивитамин D <sub>3</sub>	≥100%
Холекальциферол (D <sub>3</sub> )	<0.01%
Эргокальциферол (D <sub>2</sub> )	<0.30%



### ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»  
ул. Чорновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)