

НАБІР ІФА
ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИМІРУ 25-
ГІДРОКСИВІТАМІНУ D₂ І D₃

3810, Aeskulisa 25OH Vitamin D Total

Кат. № : **3810**
Кількість : **96**
Виробник : **AESKU. Diagnostics,**
(Німеччина)

Методика від **21-07-2014**
Версія **003**

Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.



1 Призначення

AESKULISA 25OH Vitamin D Total є твердофазним імуноферментним аналізом для *in vitro* кількісного виміру 25-гідроксивітаміну D₂ і D₃ (25 (OH) D₂ і 25 (OH) D₃) в сироватці крові. Аналіз є інструментом для визначення в сироватці крові статусу вітаміну D.

2 Клінічне застосування і принцип аналізу (Див. оригінал інструкції).

Принцип тесту

Набір **AESKULISA 25OH Vitamin D Total** є твердофазним імуноферментним аналізом, який виконується на титраційних мікропланшетах. Зразки сироватки інкубують в лунках, що дозволяє загальному 25OH Вітаміну D (D₂ і D₃), присутньому в сироватці, відділитись від зв'язаних білків сироватки і зв'язатись з моноклональними антитілами. Після стадії промивки, певна кількість міченого біотином 25OH Вітаміну D в присутності пероксидази хрому (HRP) конкурує з неміченим 25OH Вітаміну D сироватки, пов'язаним з моноклональним антитілом. Надлишок міченого біотином 25OH Вітаміну D вимивається після інкубації. Додавання ТМВ-субстрату генерує ферментативну колориметричну реакцію (синій колір), яка зупиняється додаванням розведеної кислоти (колір змінюється на жовтий). Інтенсивність формування кольору після хромогенної реакції є функцією від кількості міченого біотином 25OH Вітаміну D, пов'язаного з моноклональними антитілами і обернено пропорційна концентрації 25OH Вітаміну D₃ і D₂, присутніх у зразках. Концентрація 25OH Вітаміну D₃ і D₂ в зразках екстраполюється шляхом інтерполяції дози за допомогою калібрувальної кривої, отриманої з щільності стандартів.

3 Комплект поставки

МАЮТЬ БУТИ ВІДНОВЛЕНІ				
Компонент	Кількість	Колір ковпачка	Колір розчину	Опис/вміст
Калібратор А	1 х ліофілізований	Білий	--	Біологічна матриця з гентаміцином і прокліном
Калібратор В-Ф	5 х ліофілізований	Білий	--	Калібратори В-Ф в кінській сироватці з гентаміцином і прокліном
Контроль D (Сop D)	1 х ліофілізований	Червоний	--	Дефіцитна сироватка людини
Контроль N (Сop N)	1 х ліофілізований	Зелений	--	Нормальна сироватка людини
Концентрований Кон'югат	1 х 0.2 мл	Синій	Помаранчевий	100х концентрат 25OH Вітамін D, кон'югований з біотином
Промивний буфер (50х)	1 х 20 мл	Білий	Зелений	50 х концентрований Тріс, NaCl, Твін 20, азид натрію < 0.1% (консервант)
ГОТОВІ ДО ВИКОРИСТАННЯ				
Компонент	Кількість	Колір ковпачка	Колір розчину	Опис/вміст
Інкубаційний Буфер	1 х 20 мл	Зелений	Безколірний	Казеїн
Кон'югат	1 х 20 мл	Синій	Безколірний	Казеїн та стрептавідин HRP
Субстрат ТМВ	1 х 15 мл	Чорний	Безколірний	Стабілізований ТМВ/H ₂ O ₂

Стоп Розчин	1 х 15 мл	Білий	Безколірний	1 М соляної кислоти
Мікропланшет	12 х 8-лункових смужок	--	--	Смужки, які відокремлюються. Покриття див. розділ 2
* Колір збільшується з концентрацією				
НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ				
Планшетний рідер з фільтром 450 нм і референтним фільтром (600-690 нм). Скляний посуд (циліндр 100-1000 мл), пробірки для розведення. Вортекс, шейк ер (400-700 об./хв.), піпетки прецизійні (10, 100, 200, 500, 1000 мкл) або регульована мультипіпетка (100-1000 мл). Мікропланшетний Пристрій для промивки (300 мкл повторювання або багатоканальна піпетка або автоматизована система), адсорбуючий папір. Наші тести призначені для використання з очищеною водою відповідно до визначення Фармакопеї США (USP 26 – NF 21) та Європейської Фармакопеї (Eur.Ph. 4-е вид).				

4 Зберігання та термін придатності

Зберігати всі реагенти і мікропланшет при температурі 2-8 °C/35-46 °F, в оригінальній упаковці. Готові, відновлені розчини стабільні протягом 8 тижнів при температурі 2-8 °C/35-46 °F, як мінімум. Для більш тривалого зберігання аліквоти слід зберігати при температурі -20 °C протягом не більше 3 місяців. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання. Реагенти і мікропланшет повинні використовуватися тільки в межах терміну придатності, зазначеного на кожному компоненті. Уникайте інтенсивного впливу світла на ТМВ розчин. Зберігайте мікропланшети в призначеній для цього фользі, в тому числі з осушувачем, і щільно закривайте. Робочий промивний розчин і розчин кон'югату повинні бути свіжо підготовлені кожен раз.

5 Безпека використання

5.1 Небезпека для здоров'я

ЦЕЙ ПРОДУКТ ПРИЗНАЧЕНИЙ ТІЛЬКИ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ IN VITRO.

Таким чином, тільки персонал, навчений і спеціально інформований щодо методів діагностики в пробірці, може проводити аналіз. Хоча цей продукт не вважається особливо токсичним або небезпечним в умовах нормального використання, притримуйтеся наступних заходів для максимальної безпеки:

Рекомендації та заходи безпеки

Цей комплект містить потенційно небезпечні компоненти. Хоча реагенти не класифіковані як подразник для очей і шкіри, ми рекомендуємо уникнути контакту з очима та шкірою і носити одноразові рукавички.

УВАГА! Калібратори, Контролі та Буфери містять азид натрію (NaN₃) як консервант. NaN₃ може бути токсичним, якщо його проковтнути або при попаданні на шкіру і очі. NaN₃ може реагувати зі свинцем і міддю і формувати вибухонебезпечні азиди металів. При знищенні, змити з великою кількістю води, щоб запобігти накопиченню азидів. Будь ласка, зверніться до процедур дезактивації, як це викладено CDC або до інших місцевих/національних керівних принципів.

Не паліть, не їжте і не пийте під час роботи з набором. Не піпетувати ротом.

Весь вихідний людський матеріал, що використовується для деяких реагентів цього набору (контролі, стандарти, наприклад), був протестований схваленими методами, і був негативним до HbsAg, гепатиту С та ВІЛ 1. Проте, жоден тест не може гарантувати відсутність вірусних агентів у таких матеріалах повністю. Таким чином, поводитись з контролями, стандартами і зразками пацієнтів як з потенційним джерелом інфекційних захворювань і відповідно до національних вимог. Комплект містить матеріал тваринного походження, як зазначено в таблиці змісту, поводитись відповідно до національних вимог.

5.2 Загальні зауваження щодо використання

У разі, якщо інформація про продукт, в тому числі маркування, є спотвореною або неправильною, будь ласка, зверніться до виробника чи постачальника тест-набору. Не змішуйте і не замінюйте реагенти або Мікропланшети з різних лотів. Це може привести до змін в результатах.

Привести всі компоненти до кімнатної температури (20-32 °C/68-89.6 °F) перед використанням, добре перемішати і дотримуватись рекомендованої інкубаційної схеми для оптимального виконання тесту.

Інкубація: Ми рекомендуємо проводити тест при 23 °C/73.4 °F для автоматизованих систем.

Ніколи не надавайте компоненти більш високій температурі, ніж 37 °C/98.6 °F.

Завжди проводити піпетування розчину субстрату тільки з новими наконечниками. Захищати цей реагент від світла. Ніколи не піпетувати

кон'югат з наконечниками, які використовувались з іншими реагентами до цього.

Рекомендується запускати калібратори, контролі і зразки у двох примірниках.

Щоб уникнути зміщення, час між відбором першого калібратора і останнього зразка повинен бути обмежений до 10 хвилин максимум.

Побудувати калібрувальну криву для кожного прогону. Не використовуйте дані з попередніх запусків.

Вносити хромогенний розчин протягом 15 хвилин після промивання лунок мікропланшета.

6 Відбір проб, Використання та Зберігання

Використовуйте переважно свіжо зібрані зразки сироватки. Забір крові повинен проводитись відповідно до державних вимог. Не використовуйте іктеричні, ліпемічні, гемолізовані або бактеріально забруднені зразки. Сироватки з частинками повинні бути очищені низькошвидкісним центрифугуванням (<1000 x g). Зразки крові повинні бути зібрані в чисті, сухі і порожні пробірки.

Після сепарації, зразки сироватки слід використовувати протягом 8 годин, зберігати щільно закритими при температурі 2-8 °C/35-46 °F до 48 годин або замороженими при -20 °C/-4 °F для більш тривалих періодів.

7 Процедура аналізу

7.1 Підготовчі заходи перед початком роботи

Розвести концентровані реагенти:

Розвести концентрований Промивний буфер 1:50 дистильованою водою (наприклад, 20 мл плюс 980 мл).

Підготувати калібратори і контролі:

Калібратори A-F: відновити калібратори з 1 мл дистильованої води кожен.

Контролі Con D і Con N: відновити контролі з 1 мл дистильованої води кожен.

Ретельно перемішати для повного розчинення, використовуючи вихровий змішувач або обертання.

Підготувати робочий розчин кон'югату:

Робочий розчин кон'югату повинен бути підготовлений перед початком кроку інкубації зразка.

Приготуйте тільки стільки робочого розчину кон'югату, скільки необхідно для кожного запуску шляхом розбавлення концентрованого кон'югату (100x) з кон'югатом у співвідношенні 1:100, відповідно до кількості смужок (наприклад, при ручному методі, 6 смужок: розбавлення 50 мкл концентрованого кон'югату з 5 мл кон'югату).

Будь ласка, зверніть увагу на необхідність додаткового об'єму при використанні автоматизованих систем.

Використовуйте вортекс для гомогенізації. Зберігайте робочий розчин HRP кон'югату при кімнатній температурі і уникайте впливу прямих сонячних променів. Розбавлений кон'югат має обмежений термін придатності! Не використовуйте залишки розчинів пізніше.

Автоматизоване промивання:

Врахувати надлишкові обсяги, необхідні для налаштування приладу, і мертві обсяги для автоматизованого піпетування.

Ручне промивання:

Видалити рідини з лунок перекиданням планшета. Постукати рамкою з мікролунками енергійно на чистий адсорбуючий папір. Внести 350 мкл розведеного промивного буфера в кожну лунку, почекати 20 секунд. Повторити всю процедуру два рази.

Мікропланшети:

Розрахуйте кількість лунок, необхідних для аналізу. Видалити зайві лунки з рамки, помістити в пакет і зберігати разом з осушувачем, щільно закритими (2-8 °C/35-46 °F).

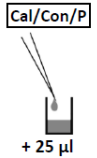
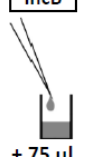

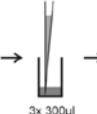
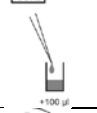

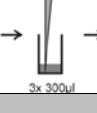
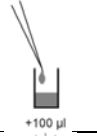

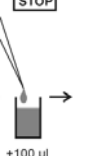
7.2 Схема Піпетування


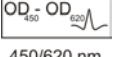
Ми пропонуємо піпетувати калібратори, контролі і зразки таким чином:

	1	2	3	4...
A	CalA	CalE	P1	
B	CalA	CalE	P1	
C	CalB	CalF	P2	
D	CalB	CalF	P2	
E	CalC	ConD	P3	
F	CalC	ConD	P3	
G	CalD	ConN	...	
H	CalD	ConN	...	

CalA: калібратор A	CalD: калібратор D	Con D: Контроль D	P1: пацієнт 1
CalB: калібратор B	CalE: калібратор E	Con N: Контроль N	P2: пацієнт 2
CalC: калібратор C	CalF: калібратор F		P3: пацієнт 3

7.3 Проведення тестування

Крок	Опис
	Переконайтеся, що підготовка відповідно до пункту 7.1 вище була проведена перед піпетуванням.
1.	Дозволити всім компонентам досягти кімнатної температури (20-32 °C/ 68-89.6 °F) перед використанням, добре перемішати і дотримуватись рекомендованої схеми інкубації.
КАЛІБРАТОРИ, КОНТРОЛІ І ЗРАЗКИ	
2.	 <p>Внести в зазначені лунки, як описано в розділі 7.2 вище, 25 мкл кожного:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Калібраторів (CAL.A до CAL.F) • Контролю D (Con D), Контролю N (Con N), і 100 мкл кожного з наступних: • Не розведеної сироватки пацієнта (P1, P2 ...)
3.	 <p>Внесіть 75 мкл Буфера для Інкубації в усі лунки.</p>
4.	 <p>Інкубувати протягом 60 хвилин при КТ на планшетному шейкері (400-700 об./хв.).</p>
5.	 <p>Аспірувати рідину з кожної лунки і промити пластини три рази з 300 мкл промивного буфера (розведений 1:50). Аспірувати рідину після кожного циклу промивання.</p>
КОН'ЮГАТ	
6.	 <p>Внести 100 мкл робочого розчину кон'югату в кожну лунку.</p>
7.	 <p>Інкубувати протягом 30 хвилин при КТ на планшетному шейкері (400-700 об./хв.).</p>
8.	 <p>Аспірувати рідину з кожної лунки і промити пластини три рази з 300 мкл промивного буфера (розведений 1:50). Аспірувати рідину після кожного циклу промивання.</p>
СУБСТРАТ	
9.	 <p>Внести 100 мкл ТМБ субстрату в кожну лунку на протязі 15 хвилин після кроку промивання.</p>
10.	 <p>Інкубувати протягом 30 хвилин при КТ на планшетному шейкері (400-700 об./хв.), захищений від інтенсивного світла.</p>
СТОП РОЗЧИН	
11.	 <p>Внести 100 мкл стоп-розчину в кожну лунку, використовуючи той же порядок, що і при піпетуванні субстрату.</p>

12.	 5'	Колювати пластину ретельно протягом 5 секунд, інкубують протягом 5 хвилин при кімнатній температурі.
13.	 450/620 nm	Виміряти оптичну щільність при 450 нм (рекомендується 620 нм) протягом 30 хвилин і розрахувати результати як описано в розділі 8.

8 Розрахунок результатів

Побудова калібрувальної кривої

Для побудови калібрувальної кривої, розрахувати середню оптичну щільність кожного калібратора, контролю та зразка. Для кожного калібратора, контролю та зразка, обчислити наступне (B0 = поглинання калібратора А, B = поглинання):

$$B/B0(\%) = \frac{OD(\text{Calibrator, Control, Sample})}{OD(\text{Calibrator A})} \times 100$$

Щоб побудувати стандартну криву, значення B/B0 (%) кожного калібратора відкласти проти відповідної концентрації 25 ОН Вітаміну D, використовуючи або лінійний графік, або напівлогарифмічний папір. За допомогою інтерполяції значень зразка B/B0 (%) визначити концентрації 25 ОН Вітаміну D в зразках з використанням калібрувальної кривої. Комп'ютерні методи також можуть бути використані для побудови калібрувальної кривої. Якщо використовується автоматична обробка результатів, рекомендується 4-параметрова логістична крива.

Приклад стандартної кривої

Для кожного визначення, будь ласка, побудувати нову калібрувальну криву. Будь ласка, зверніть увагу, що концентрації калібраторів є специфічними для кожного лота.

Не використовувати цей приклад для інтерпретації результатів пацієнтів!

Калібратор	Концентрація	Одиниці OD
A	0 нг/мл	2.25
B	6 нг/мл	2.07
C	13 нг/мл	1.83
D	23 нг/мл	1.43
E	52 нг/мл	0.78
F	130 нг/мл	0.25

1 нг/мл = 2.496 пмоль/мл

Оцінка значень

Рівні 25 ОН вітаміну D, як правило, залежать від харчового раціону, сезону, кліматичної зони, віку, кольору шкіри і генетичного фону. Кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон на основі їх місцевого населення.

Німецький Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) рекомендує відповідно до Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), Інституту медицини (ІОМ) і Національного інституту здоров'я (NIH) наступні довідкові діапазони для концентрації в сироватці 25 ОН Вітаміну D.

Серйозний дефіцит	< 12 нг/мл	< 30 нмоль/л
Недостатність	12 - 20 нг/мл	30 - 50 нмоль/л
Достатність	≥ 20 нг/мл	≥ 50 нмоль/л
Інттоксикація Вітаміну D	> 160 нг/мл	> 400 нмоль/л

коефіцієнт конверсії SI: для конвертації значень 25(OH)D в нмоль/л, помножте на 2.496.

9 Технічні дані

Матеріал зразка:	сироватка
Об'єм зразка:	25 мкл зразка, не розведеного
Загальний час інкубації:	2 години при КТ зі струшуванням
Діапазон калібрування:	0-130 нг/мл (0-325 нмоль/л), лот специфічний
Аналітична чутливість:	3.8 нг/мл
Зберігання:	при температурі 2-8 °C/35-46 °F використовуйте тільки оригінальні флакони
Кількість визначень:	96 тестів

10 Робочі характеристики

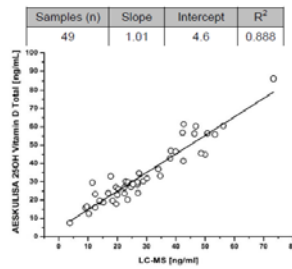
10.1 Аналітична Чутливість

Аналітична чутливість була визначена відповідно до CLSI EP17- А пісбників і становить 3.8 нг/мл.

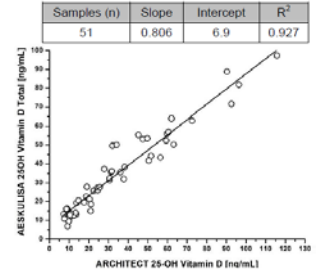
10.2 Порівняння методів

Набір AESKULISA Вітаміну D Total ІФА порівнювали з методом LC-MS (рідинна хроматографія-мас-спектрометрія) і хемілюмінесцентним імуноаналізом на мікрочастинках (СМА, ARCHITECT 25-ОН Вітаміну D, Abbott). Кореляцію цих тестів з AESKULISA 25 ОН Вітаміну D Total було визначено за допомогою лінійної регресії даних.

Порівняння методів з LC-MS

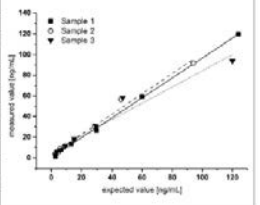


Порівняння методів з ARCHITECT 25-ОН Вітаміну D, Abbott



10.3 Лінійність

Щоб визначити лінійність AESKULISA 25 ОН Вітаміну D Загальний було проведено серійні розведення сироватки. Отримані результати порівнювалися з очікуваними, які були розраховані як частка виміряного наступного значення більш високої концентрації і коефіцієнта розведення 2. Відновлення - це відсоток виміряної величини від очікуваної. Крім того, лінійна регресія була виконана.

No.	Dilution Factor	Measured (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)	Linear Regression y = b x + a	Graph
1	1	119.8	124.0	97%	b 0.96	
	1/2	59.2	59.9	99%	a 0.27	
	1/4	26.6	29.6	90%	R ² 0.99	
	1/8	13.2	13.3	99%		
2	1	119.6	125.0	96%	b 0.97	
	1/2	71.9	59.8	120%	a 2.98	
	1/4	36.6	35.9	102%	R ² 0.98	
	1/8	19.2	18.3	105%		
3	1	91.8	94.0	98%	b 0.98	
	1/2	56.3	45.9	123%	a 2.99	
	1/4	30.4	28.2	108%	R ² 0.98	
	1/8	17.7	15.2	117%		

10.4 Точність

Для визначення точності аналізу, мінливість (всередині і між серіями) оцінювали шляхом аналізу його відтворюваності на зразках сироватки для представлення стандартної кривої.

Intra-assay		
Sample No.	Mean (ng/ml)	CV (%)
1	18.1	7
2	38.2	5
3	50.7	5
4	127.1	3

Inter-assay		
Sample No.	Mean (ng/ml)	CV (%)
1	18.2	13
2	38.2	6
3	50.7	6
4	127.1	7

10.5 Відновлення

Відновлення було визначено введенням відомої кількості 25 ОН вітаміну D₃ і 25 ОН D₂ в сироватку крові людини. Середні відновлення представлені в таблиці нижче.

	ng/ml	Recovery (%)
25OH-Vitamin D3	16.9	107
25OH-Vitamin D2	27.8	86

10.6 Вплив інтерферуючих речовин

Мікропланшет покритий моноклональним антитілом анти-Вітаміну D. Перехресна реактивність була випробувана проти речовин, представлених в таблиці нижче, і були розраховані відповідні відновлені значення.

Substance	Recovery (%)
Vitamin D3 (Cholecalciferol)	108
Vitamin D2 (Ergocalciferol)	103
3-epi-25-Hydroxyvitamin D3	92
Hemoglobin (5 g/l)	97
Bilirubin (0.5 g/l)	103
Bilirubin conjugate (1 g/l)	102
Triglycerides (5 g/l)	101



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

Пояснення символів, що використовуються на маркуванні:

	Медицинский виріб для діагностики <i>in vitro</i>
	Каталоговий номер
	Код партії
	СЕ маркування
	Національний знак відповідності
	96 тестів
	Ознайомлення з інструкціями для застосування
	Використати до
	Температурні обмеження (2-8 °C)
	Виробник
	Калібратор Cut-off
	Позитивний контроль
	Негативний контроль
	Калібратор
	Відновлювач
	Кон'югат
	Мікропланшет
	Планшет
	Промивний буфер
	Субстрат
	Стоп розчин
	Буфер для зразків



AESKU.DIAGNOSTICS GmbH & Co.KG
Mikroforum Ring 2, 55234 Wendelsheim, Germany
Phone: +49-6734-9622-0
FAX: +49-6734-9622-2222
WWW.AESKU.COM