



25-OH ВИТАМИН D ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ НАБОР ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ 25- ГИДРОКСИВИТАМИНА D И ДРУГИХ ГИДРОКСИЛИРОВАННЫХ МЕТАБОЛИТОВ В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ

Кат. №: AC-57F1/ AC-57F2
Производитель: IDS (Великобритания)

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

Методика от 29-06-2012
Версия 10

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 гидроксигируется 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 гидроксигируется в почках под контролем паратгормона и уровня ионизированного кальция до биологически активной формы 1,25-дигидроксивитамина D (1,25(OH)₂ Vit D).

Дальнейшее гидроксигирование 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 разводят 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 латуниью и образовывать взрывчатые азиды металлов. Смойте 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.

Тетрамилбензидин

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

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 переворачиванием. 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 M 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 ещё дважды.
6. Просушите ячейки переворачиванием на фильтровальную бумагу или другой абсорбент для удаления остатков промывочного раствора. Переходите к следующему шагу.
7. 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.
8. Повторите шаг 5.
9. 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.
10. Добавьте **100 мкл** Стоп-раствора (соляной кислоты) во все ячейки с использованием многоканального дозатора.
11. 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-параметровую 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 2.530	2.503		
B1, B2	Калибратор 1 6,8 нмоль/л	2.313 2.288	2.301	91.9	
C1, C2	Калибратор 2 14 нмоль/л	1.912 1.908	1.910	76.3	
D1, D2	Контроль 3 27 нмоль/л	1.495 1.499	1.497	59.8	
E1, E2	Контроль 4 67 нмоль/л	0.919 0.905	0.912	36.4	
F1, F2	Калибратор 5 179 нмоль/л	0.521 0.522	0.522	20.8	
G1, G2	Калибратор 6 380 нмоль/л	0.372 0.368	0.370	14.8	
H1, H2	Образец пациента 1	1.237 1.257	1.247	49.8	39
A3, A4	Образец пациента 2	0.951 0.969	0.960	38.4	62
B3, B4	Образец пациента 3	0.591 0.612	0.602	24.0	138

Типичная калибровочная кривая

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

КАЛИБРОВКА

Калибраторы витамина 25-OH 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:

- a) 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.

- b) 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-OH 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-OH 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-OH 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 ₂	100%
25-гидроксивитамин D ₃	75%
24,25-дигидроксивитамин D ₃	≥100%
Холекальциферол (D ₃)	<0,01%
Эргокальциферол (D ₂)	<0,30%

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «ДИАМЕБ»
ООО «БиоТехЛаб-С»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 612
e-mail: www.diameb.ua
www.biotechlab-s.com.ua